

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y FUNCIONES STEM:
PAPEL DE LA IL-8 EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DE
LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE SENO MCF-7 EN
CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA ANOIKIS.**

Natalia Ospina Muñoz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2020

**TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y FUNCIONES STEM:
PAPEL DE LA IL-8 EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DE
LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE SENO MCF-7 EN
CONDICIONES DE RESISTENCIA A LA ANOIKIS.**

Natalia Ospina Muñoz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Biomédicas

Director:

Dr. Jean Paul Vernot, Biólogo, Ph.D.

Grupo de Fisiología Celular y Molecular (FCM)

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2020

A Dios.

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor y director de tesis de doctorado, Dr. Jean Paul Vernot PhD, quien con sus conocimientos y apoyo me guió a través de cada una de las etapas de la investigación.

También quiero agradecer a Colciencias, al Banco de la República y a la Universidad Nacional de Colombia por brindarme los recursos económicos para llevar a cabo la investigación.

También quiero agradecer al Dr. Bumsoo Han PhD quien abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad de Purdue para realizar mi pasantía.

Por último, quiero agradecer a Dios, a mi familia, a mis amigos y compañeros, por apoyarme aún cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero mencionar a mi madre, que siempre estuvo ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

A todos muchas gracias.

Resumen

La Interleuquina 8 (IL-8) es un importante regulador del microambiente tumoral (MAT), promoviendo la transición epitelio mesenquimal (EMT) y la adquisición de propiedades de células *stem* por parte de las células tumorales (CSC). El ensayo de formación de mamoesferas se ha utilizado para la identificación y enriquecimiento de las CSC. La IL-8 induce la formación de mamoesferas más grandes, lo que sugiere el enriquecimiento de CSC. En el presente trabajo nuestro objetivo fue estudiar las características fenotípicas y funcionales de las células presentes en las mamoesferas de las células MCF-7 previamente tratadas con IL-8. Las células MCF-7 adheridas fueron tratadas con IL-8 durante 5 días y luego fueron cultivadas por 5 días más en condiciones no adherentes (resistencia a la anoikis). Demostramos que la presencia de mamoesferas con mayor tamaño en la condición IL-8, no fue consecuencia de una mayor proliferación mediada por esta citoquina. Se encontró que a pesar del mantenimiento del fenotipo EMT con presencia de células híbridas que expresaban tanto E-cadherina como SNAI2, las propiedades esenciales de células *stem* se vieron afectadas en las mamoesferas tratadas con IL-8. La capacidad de autorrenovación se incrementó en las células tratadas con IL-8 solo en la primera generación de mamoesferas, pero este incremento no se sostuvo en ensayos consecutivos. En consecuencia, la autorrenovación, la reprogramación, la capacidad de diferenciación a adipocitos y la clonogenicidad también se vieron afectadas. También, mostramos que las mamoesferas estaban enriquecidas en células luminales diferenciadas (EpCAM+/CD49f-). Además, las células MCF-7 aisladas de mamoesferas derivadas de IL-8 también presentaron una mayor migración e invasión dirigida por IL-8. Adicionalmente, las células dentro de las mamoesferas derivadas del tratamiento con IL-8 fueron altamente resistentes al Paclitaxel (PLX) y la Doxorubicina (DOX). Por lo tanto, mostramos aquí que la línea de cáncer de seno no agresiva MCF-7, a pesar de un índice bajo de funciones *stem*, podría adquirir selectivamente atributos particulares de células *stem* muy relevantes para la progresión del cáncer.

Palabras clave:

Mamoesferas (Msph), Interleuquina 8 IL-8, Transición epitelio- mesenquimal (EMT), células *stem* tumorales (CSC), Microambiente tumoral (MAT)

Abstract

The Interleukin 8 (IL-8) is an important regulator of the tumor microenvironment (TME), promoting the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the acquisition of stem-like cell properties in cancer cells (CSC). The mammosphere-formation assay has been used for the identification of CSC. IL-8 induces the formation of larger mammospheres, suggesting CSC enrichment. In the present work, we aimed to study the phenotypic and functional characteristics of the cells present within the mammospheres of MCF-7 cells previously treated with IL-8. MCF-7 cells treated for 5 days or not with this cytokine, were further cultivated in ultralow attachment (anoikis) plates for another 5 days to allow mammospheres formation. We showed that the enhanced mammospheres formation by MCF-7 cells was not a consequence of higher cell proliferation by IL-8 stimulation. Despite maintaining an EMT phenotype with the presence of hybrid cells expressing both E-cadherin and SNAI2, essential stemness properties were impaired in mammospheres treated with IL-8. Self-renewal capacity was increased in IL-8-treated cells only in the first generation of mammospheres but was not sustained in consecutive assays. Accordingly, self-renewal and reprogramming gene expression, differentiation capacity to adipocytes and clonogenicity were also impaired. We showed also that mammospheres were enriched in differentiated luminal cells (EpCAM+/CD49f-). Furthermore, MCF-7 cells isolated from IL-8-derived mammospheres presented also higher IL-8-directed-migration and -invasion. Consistent with this, they were also highly resistant to Paclitaxel (PLX) and Doxorubicin (DOX). Therefore, we showed here that the non-aggressive breast cancer line MCF-7, despite having a low stemness index, might selectively acquire particular stem-like cell attributes very relevant for cancer progression.

Contenido	
Resumen	4
Palabras clave:.....	4
Abstract	5
Lista de figuras	9
Lista de tablas	11
Lista de símbolos y abreviaturas	11
1. Introducción	15
2. Justificación	19
3. Objetivos de la investigación	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Marco teórico	22
4.1. Cáncer de seno.....	22
4.2. Senescencia e inflamación.....	23
4.2.1. Interleuquina 8 (IL-8).	26
4.3. Transición epitelio-mesenquimal (EMT).....	28
4.3.1. Fenotipo híbrido.....	31
4.3.2. Rutas de señalización asociadas a la EMT.	32
4.4. Células <i>stem</i> tumorales CSC.	32
4.4.1. Marcadores de superficie de CSC.....	34
4.4.2. Anoikis.	36
4.5. Microambiente tumoral (MAT).....	37
5. Metodología.....	41
5.1. Cultivo línea celular de cáncer de seno MCF-7.....	41
5.2. Tratamiento de las células MCF-7 con IL-8.....	41
5.3. Ensayo de formación de mamoesferas.	41
5.4. Doblaje poblacional.....	42
5.5. Ensayo de proliferación celular y expresión de Ki67 en células adheridas.	42
5.6. Extracción de RNA y qRT-PCR.....	43
5.7. Ensayo de Western blot para marcadores de EMT	45

5.8.	Ensayo consecutivo de formación de mamoesferas	45
5.9.	Ensayo curación de heridas.....	46
5.10.	Ensayo de migración e invasión dirigida.....	46
5.11.	Selección de células a través del sistema TW.....	47
5.12.	Ensayos de diferenciación a linajes adipo-, condro- y osteogénicos. ...	47
5.13.	Análisis de expresión génica - diferenciación multipotente.....	48
5.14.	Ensayo de quimiorresistencia.....	48
5.15.	Análisis por citometría-Inmunofenotipo.....	48
5.16.	Ensayo clonogénico.....	49
5.17.	Análisis estadístico	49
6.	Resultados.....	51
6.1.	Capítulo I: Efecto de la IL-8 sobre las características fenotípicas (CD44, CD24, CD49f, EpCAM, ALDH y E-cadherina), la expresión de marcadores asociados a la EMT y la frecuencia de CSC en las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas.....	51
6.1.1.	La IL-8 promueve cambios morfológicos, la adquisición de un programa parcial de EMT, y aumento en la capacidad de formación de mamoesferas sin alterar la proliferación en la línea celular MCF-7.....	51
6.1.2.	Identificación de dos poblaciones celulares que difieren en su proporción y en la expresión de marcadores de superficie (CD44, CD24, CD49f y EpCAM)	57
6.1.3.	El cultivo no adherente aumenta la actividad de la enzima ALDH de una manera independiente de IL-8.....	63
6.1.4.	La IL-8 promueve la reducción en la expresión de E-cadherina y un aumento en su co-expresión con CD24 y EpCAM en las células de las mamoesferas.....	64
6.2.	Capítulo II: Efecto de la IL-8 sobre las características funcionales de las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas: capacidad de autorrenovación, diferenciación multilínea y potencial clonogénico.....	66
6.2.1.	La capacidad de autorrenovación y la expresión de genes asociados a este proceso disminuyen en las células aisladas de las mamoesferas.....	66
6.2.2.	La expresión de genes asociados a reprogramación celular disminuye en las células aisladas de las mamoesferas.....	68
6.2.3.	La diferenciación multilínea está afectada en las células aisladas de mamoesferas previamente tratadas con IL-8.....	69

6.2.4. El potencial clonogénico está afectado en las células obtenidas de las mamoesferas.	72
6.3. Capítulo III: Efecto de la IL-8 sobre la capacidad de migración, invasión y quimiorresistencia en las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas.....	73
6.3.1. La IL-8 potencia la capacidad de migración e invasión de las células provenientes de mamoesferas.....	73
6.3.2. Las células provenientes de mamoesferas inducidas previamente con IL-8 son resistentes al tratamiento con Paclitaxel (PLX) y Doxorubicina (DOX). 77	
6.3.3. La capacidad de migración de las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas se reduce a medida que aumentan las selecciones.	79
7. DISCUSIÓN.....	81
8. CONCLUSIONES.....	90
9. PERSPECTIVAS	91
10. PRODUCTOS ACADEMICOS.....	92
ANEXO 1.	93
ANEXO 2.	94
ANEXO 3.	108
11. BIBLIOGRAFÍA.....	109

Lista de figuras

Figura 1. La IL-8 promueve cambios morfológicos en las células adheridas.	52
Figura 2. Capacidad de formación de mamoesferas.....	53
Figura 3. Doblaje poblacional y proliferación celular.....	55
Figura 4. Expresión de marcadores asociados a la EMT.	56
Figura 5. Caracterización fenotípica de las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.....	58
Figura 6. Dos subpoblaciones celulares definidas por FSC-Low y FSC-High en células tratadas o no con IL-8.....	59
Figura 7. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.	60
Figura 8. A) Diagrama de las características fenotípicas de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en las células Adh y en las células aisladas de Msph. Comparación entre FSC-High Adh vs Msph y FSC-Low Adh vs Msph.....	61
Figura 9. Expresión de CD44 y CD24 de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.....	62
Figura 10. Expresión de CD49f y EpCAM de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.....	63

Figura 11. Actividad enzima Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.....	64
Figura 12. Expresión de CD24 y E-cadherina en células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.	65
Figura 13. Capacidad de autorrenovación.	67
Figura 14. Capacidad de reprogramación celular.....	69
Figura 15. Capacidad de diferenciación multilinaje de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.	71
Figura 16. Capacidad clonogénica de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.	72
Figura 17. Capacidad de migración de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.....	73
Figura 18. Expresión de CXCR1en células adheridas tratadas o no con IL-8.	75
Figura 19. Capacidad de migración e invasión de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.	76
Figura 20. Quimiorresistencia en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.	78
Figura 21. Evaluación de la capacidad de migración de las células adheridas y células aisladas de mamoesferas a través de varios procesos de selección.	80

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia de primers.	44
Tabla 2. Cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en las poblaciones FSC Low y FSC High en células adheridas y células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.....	59
Tabla 3. Efecto de la IL-8 en la frecuencia de las células stem: Análisis de dilución limitante extrema (ELDA) para la evaluación de la frecuencia de células stem. Las células se cultivaron en condiciones no adherentes y se contaron después de 5 días de cultivo.	68

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

<i>IL-8</i>	Interleuquina 8
<i>CSC</i>	Células stem tumorales
<i>EMT</i>	Transición epitelio mesenquimal
<i>MAT</i>	Microambiente tumoral
<i>HEK</i>	Human Epithelial kidney cells
<i>MECOSE</i>	Medios Condicionados de Fibroblastos Senescentes
<i>ECM</i>	Extracellular matrix
<i>FTs</i>	Factores de Transcripción
<i>TGF-β</i>	Transforming Growth Factor Beta1
<i>TNF- α</i>	Tumor necrosis factor α
<i>IL-1β</i>	Interleuquina 1 β
<i>SASP</i>	Senescence-associated secretory phenotype
<i>OIS</i>	Oncogene-induced senescence
<i>SIR</i>	Senescence Inflammatory Response
<i>TJP1</i>	Tight Junction Protein1
<i>SNAI1</i>	Snail Family Transcriptional Repressor1
<i>SNAI2</i>	Snail Family Transcriptional Repressor2
<i>TWIST1</i>	Twist Family y BHLH Transcription Factor1
<i>TWIST2</i>	Twist Family y BHLH Transcription Factor2
<i>ZEB1</i>	Zinc Finger E-box Binding Homeobox1
<i>ZEB2</i>	Zinc Finger E-box Binding Homeobox1
<i>SMA</i>	Smooth-Muscle Actin
<i>TICs</i>	Tumor-Initiating Cells
<i>BMI1</i>	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger
<i>GATA3</i>	GATA Binding Protein 3
<i>HOXB4</i>	Homeobox B4
<i>NANOG</i>	Nanog Homeobox
<i>OCT4</i>	Octamer-binding transcription Factor 4
<i>SOX2</i>	SRY-Box transcription Factor2
<i>KLF4</i>	Kruppel Like Factor4
<i>TJP1</i>	Tight Junction Protein1
<i>ER</i>	Estrogen Receptor
<i>PR</i>	Progesterone Receptor
<i>SDF1</i>	Stromalcell-derived Factor1
<i>CXCR1</i>	C-X-C Motif Chemoquine Receptor1
<i>CXCR4</i>	C-X-C Motif Chemoquine Receptor4
<i>HER1</i>	Human Epidermal growth factor Receptor2
<i>KI67</i>	Marker of proliferation KI-67
<i>NCAM1</i>	Neural Cell AdhesionMolecule1
<i>BRCA2</i>	BRCA2 DNA Repair Associated
<i>SIP1</i>	Smad Ineracting protein1
<i>SCID</i>	Severe Combined Inmune Deficient mice
<i>NOD/SCID</i>	Non-obese diabetic/severe combined immune deficiency
<i>WNT7B</i>	Wnt Family Member7B

<i>CSF-1</i>	Colony-Simulating Factor 1
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor
<i>CAFs</i>	Cancer-Associated Fibroblasts
<i>MCP1</i>	Monocyte Chemotactic Protein
<i>PDGF</i>	Platelet-Derived Growth Factor
<i>FGF</i>	Fibroblast Growth Factor
<i>IMF</i>	Intensidad Media de Fluorescencia
<i>PCP</i>	Planar Cell Polarity
<i>TW</i>	Transwell
<i>DT</i>	Doubling time

L

1.Introducción

Recientemente se ha demostrado que los tumores están conformados por una población heterogénea de células, organizadas de manera jerárquica, estando en la cúspide las células con propiedades *stem*. La hipótesis de las células *stem* sugiere que los tumores son dirigidos y mantenidos por una subpoblación de células que muestran propiedades similares a las células *stem* como: capacidad de autorrenovación y diferenciación multilínea (Badve and Nakshatri, 2012) (Liu *et al.*, 2014) (Aponte and Caicedo, 2017). La persistencia de células *stem* tumorales CSC (del inglés, Cancer *stem* cell) dentro de los tejidos es la responsable de las recaídas. Las CSC están asociadas con la iniciación, crecimiento tumoral, resistencia al tratamiento y metástasis (Mitra, Mishra and Li, 2015), es por esto que las nuevas terapias deben ser dirigidas contra esta población de células (Malhotra *et al.*, 2010) (Lawson *et al.*, 2015) (Hu *et al.*, 2017) o contra las señales del MAT que permiten el mantenimiento de células con este fenotipo (Castro-Vega *et al.*, 2015).

Mani (Mani *et al.*, 2008) y Morel (Morel *et al.*, 2008) mostraron la existencia de una estrecha relación entre las CSC y la Transición Epitelio Mesenquimal EMT (del inglés, Epithelial Mesenchymal Transition), la cual en un principio era considerada como un programa biológico que promovía modificaciones bioquímicas y celulares las cuales le permitían a las células cambiar de un fenotipo epitelial estacionario a un fenotipo mesenquimal migratorio (Hay, 1995) (Kalluri and Weinberg, 2009). Nuevos hallazgos han mostrado que la EMT no es un proceso binario sino que más bien es un programa celular que permite a las células transitar entre los fenotipos epiteliales y mesenquimales de manera dinámica y reversible generando células con fenotipos híbridos (Nieto *et al.*, 2016) (Jolly *et al.*, 2015). Las células con estos fenotipos presentan un alto grado de plasticidad celular, dotando a la célula con capacidad de iniciación tumoral y metástasis (Hollier, Evans and Mani, 2009)(Nieto *et al.*, 2016)(Jolly *et al.*, 2015), adicionalmente se ha propuesto que hay una conversión dinámica bidireccional entre las células no-CSC y CSC (Chaffer *et al.*, 2011).

El MAT es un tejido complejo que está compuesto por diferentes tipos celulares como: células tumorales, células endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune, entre otras. El crecimiento y la progresión tumoral son producto de complejas redes de señalización entre los diferentes tipos celulares dentro del MAT. Este ecosistema

proporciona numerosas oportunidades para modular el epigenoma frecuentemente independiente de su constitución genética (Gingold *et al.*, 2016). Se conoce que los tumores ya establecidos estimulan una reacción inflamatoria por la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, lo cual es aprovechado por las células tumorales para promover su propio crecimiento y progresión hacia la metástasis. Esta respuesta inflamatoria puede iniciar a través de la liberación de mediadores proinflamatorios como la Interleuquina 8 (IL-8) (Dominguez, David and Palena, 2017). La IL-8 influye de manera significativa en las propiedades de las CSC. En particular algunas células inmunes que infiltran el tumor secretan IL-8 lo cual tiene un considerable efecto pro-tumorigénico (Dominguez *et al.*, 2017). La IL-8 es una citoquina con muchas funciones biológicas importantes en la formación y desarrollo de los tumores (Yao, Lin, Chua, *et al.*, 2007). Esta citoquina ejerce su efecto a través de su unión a los receptores CXCR1/CXCR2 con lo cual modula varias rutas de señalización (Waugh and Wilson, 2008) (Todorović-Raković and Milovanović, 2013) (Palena, Hamilton and Fernando, 2012), que afectan la expresión de factores de transcripción (FTs) asociados a la EMT (SNAI2, ZEB1 y TWIST) (Long *et al.*, 2016). Altos niveles de expresión de IL-8 por parte de las células tumorales se han asociado con una mayor capacidad de invasión de un panel de líneas celulares de cáncer de seno receptor de estrógenos ER (del inglés, Estrogen Receptor) negativas (Yao, Lin, Chua, *et al.*, 2007).

En trabajos del grupo de Fisiología Celular y Molecular (FCM) de la Universidad Nacional de Colombia, y del grupo de Telómeros y Cáncer del Instituto Curie en Paris, se mostró que las células pre-malignas post-crisis HEK (del inglés, Human Epithelial Kidney cells) tienen potencial para volverse totalmente tumorigénicas exclusivamente en presencia de fibroblastos senescentes (Castro-Vega *et al.*, 2015), y al hacerlo adquieren plasticidad epitelial y propiedades de células *stem*. De manera muy interesante, las células explantadas de estos tumores adquirieron potencial tumorigénico autónomo, es decir, la capacidad de formar tumores en ratones en ausencia de un microambiente senescente (Castro-Vega *et al.*, 2015). Por otra parte, se encontró que los medios condicionados de fibroblastos senescentes (MeCoSe), influyen fuertemente la plasticidad celular de las células pre-malignas y malignas (Castro-Vega *et al.*, 2015). Adicionalmente, se observó que la exposición prolongada a los factores solubles de los MeCoSe era necesaria para mantener la respuesta senescente/inflamatoria la cual le confiere las propiedades tumorigénicas a las células. Esto señala una relación interesante entre senescencia e inflamación y sugiere que

descifrar los mecanismos moleculares por los cuales estos dos procesos pueden converger para influir sobre las características tumorigénicas de las células podría utilizarse como una estrategia de desarrollo terapéutico.

Recientemente, se mostró que el MeCoSe es capaz de inducir en una línea celular de cáncer de seno Luminal A (MCF-7) la EMT, con una alta expresión de FTs asociados con este proceso, y acompañada de una alta capacidad de migración, invasión, autorrenovación y diferenciación multipotente. La caracterización del MeCoSe mostró niveles elevados de la Interleuquina 6 (IL-6) y la Interleuquina 8 (IL-8), siendo esta última la que mejor simulaba la plasticidad epitelial y el desarrollo de propiedades *stem* logrados por el tratamiento con el MeCoSe. De manera interesante, la IL-8 generó mamoesferas de manera más rápida y de mayor tamaño que la IL-6 y que el activador clásico de la EMT, el TGF- β , sugiriendo la inducción más eficiente de CSC (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017). Lo cual es muy interesante, primero porque la senescencia es otra respuesta celular clave a la resistencia a los medicamentos (De Angelis *et al.*, 2019); segundo, las células capaces de escapar a la senescencia presentan fenotipos más agresivos (Milanovic *et al.*, 2018); y tercero, porque la eliminación de las CSC o el bloqueo de señales específicas del MAT son el foco actual de las nuevas terapias contra el cáncer (Malhotra *et al.*, 2010) (Weitzenfeld *et al.*, 2013) (Lawson *et al.*, 2015) (Weitzenfeld, Meshel and Ben-baruch, 2016).

De hecho, las propiedades de las CSC (heterogeneidad, plasticidad, capacidad de autorrenovación y diferenciación) están relacionadas con la recurrencia de la enfermedad y la resistencia a los medicamentos (Marjanovic, Weinberg and Chaffer, 2013) (Colacino *et al.*, 2018) (Choi *et al.*, 2019). La progresión del cáncer implica una pérdida gradual del fenotipo diferenciado y la adquisición de un fenotipo menos diferenciado similar al de las células *stem* (Malta *et al.*, 2018). Por esta razón, sería útil determinar que propiedades específicas adquieren las CSC en cuanto a programas moleculares comunes a las células *stem* y las propiedades de autorrenovación y generación de progenie diferenciada en circunstancias particulares. Aunque dependiendo del MAT o del nicho en el que se encuentren, las CSC pueden presentar distintos programas biológicos es probable que ciertas características genéticas específicas sean compartidas por las células *stem* y las CSC (Lanza *et al.*, 2009). Se han evaluado perfiles moleculares de tumores primarios donde se han analizado las características genómicas, epigenéticas, transcriptómicas, postraduccionales, histopatológicas y clínicas (Hoadley *et al.*, 2014). El análisis de estas

características mediante enfoques bioinformáticos han mostrado una fuerte correlación entre los programas moleculares asociados a células *stem* y el estado de dediferenciación y la pluripotencia (Bai *et al.*, 2020) (Zhang *et al.*, 2020). Esto permitió el uso de métricas moleculares para descifrar el grado de dediferenciación de las células tumorales y el grado de similitud con las células *stem*. El grado de similitud con las células *stem* define la capacidad que tienen las CSC para autorrenovarse y diferenciarse en células maduras. Los perfiles transcripcionales permiten evaluar las funciones *stem* adquiridas por las células tumorales (Zheng *et al.*, 2020).

En el cáncer de seno, un índice de adquisición de funciones *stem* alto (mRNAsi), está asociado con procesos de dediferenciación, subtipos basales, mutaciones en p53, y metástasis (Malta *et al.*, 2018). Es de destacar que el subtipo Luminal A de cáncer de seno presentó el menor índice de funciones *stem* (Malta *et al.*, 2018) (Ben-Porath *et al.*, 2008). En otro estudio, el mRNAsi se asoció a decisiones sobre el destino celular, ciclo celular, senescencia y división mitótica (Pei, Wang and Li, 2020). Sin embargo, en estos estudios se obtuvieron datos genómicos de tumores primarios que ya estaban preconfigurados en un estado *stem*. Sería importante distinguir entre las funciones *stem* inherentes de las células tumorales y las inducidas por el MAT. Por lo tanto, un sistema experimental en el que las células tumorales adquieran características asociadas a funciones *stem* podría revelar mejor las funciones de las CSC.

Se desarrollo un ensayo de formación de mamoesferas (cultivo en condiciones de baja adherencia) para identificar, aislar y propagar las CSC (Dontu *et al.*, 2003). Este ensayo reta a las células, sobreviviendo solo aquellas resistentes a la anoikis. Interesantemente, el tratamiento previo con IL-8 de las células MCF-7 indujo una mayor y más rápida (>500 μm) formación de mamoesferas comparado con las células no tratadas (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernet, 2017). En el presente trabajo nuestro objetivo fue estudiar si la mayor capacidad de formación de mamoesferas podía indicar la adquisición de funciones particulares similares a las de las células *stem* por parte de las células MCF-7. Nuestra hipótesis fue que la inducción de la EMT por el tratamiento con IL-8, seguido de la formación de mamoesferas de las células MCF-7, permitiría la adquisición de propiedades *stem* particulares por parte de estas células y además su caracterización lo que permitiría la comprensión de la dinámica de las CSC y su relación con los progenitores más diferenciados (Ponti *et al.*, 2005).

2. Justificación

Los tumores tienen varias características biológicas importantes, entre ellas el mantenimiento de la señalización proliferativa, la resistencia a la muerte celular, la inducción de angiogénesis, la evasión del sistema inmune, la activación de la invasión de tejidos adyacentes y la metástasis (Hanahan and Weinberg, 2011). Además, están conformados por una población heterogénea de células, organizadas de manera jerárquica, estando en la cúspide las células con propiedades de células *stem*, que se caracterizan por tener capacidad de autorrenovación, propagación ilimitada, y diferenciación multilinaje (Wang *et al.*, 2014). Se cree que las células tumorales con estas propiedades son las responsables de la iniciación del tumor, la metástasis y la resistencia al tratamiento, sugiriendo que las nuevas terapias y la investigación debe ser dirigida hacia esta población de células (Malhotra *et al.*, 2010) (Lawson *et al.*, 2015) o hacia las señales del MAT que permiten el mantenimiento de estas células (Castro-Vega *et al.*, 2015). Por esta razón es importante estudiar las características moleculares, fenotípicas y funcionales, asociadas con la EMT y el mantenimiento de las CSC. Entender la relación entre la EMT y las CSC es fundamental para comprender el desarrollo y la progresión tumoral para así avanzar en el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas basadas en este conocimiento.

Dentro del MAT se ha establecido que la senescencia y la inflamación están relacionadas con la progresión tumoral, donde la IL-8 tiene un papel importante. Niveles elevados de IL-8 en suero de pacientes con cáncer de colon, vejiga, melanoma, pulmón, seno entre otros se asocia con mal pronóstico (Singh *et al.*, 2013). A este respecto no se conoce muy bien el papel de la IL-8 en la generación de células con propiedades *stem* y la promoción de la EMT. Tampoco son conocidas las características fenotípicas y funcionales de las células presentes en las mamoesferas. Por lo tanto, una mejor comprensión de estos aspectos puede tener una utilidad práctica en el tratamiento del cáncer.

En este trabajo se evaluó la influencia de la IL-8 sobre el fenotipo y la funcionalidad de las células MCF-7 cuando son cultivadas en condiciones no adherentes (resistencia a la anoikis), así como su efecto sobre en la expresión de marcadores de superficie, la capacidad de autorrenovación, diferenciación multilinaje, clonogenicidad, migración/invasión y la quimiorresistencia, con lo cual se busca contribuir a la comprensión

del papel de la IL-8 en la promoción de la adquisición de fenotipos más agresivos por parte de una línea celular no agresiva MCF-7.

3. Objetivos de la investigación

3.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípica- y funcionalmente las células presentes en las mamoesferas de la línea celular MCF-7 inducidas por la IL-8 en relación a la inducción de la EMT y la adquisición de funciones *stem*.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Establecer las características fenotípicas y funcionales de las células presentes en las mamoesferas de MCF-7 inducidas con IL-8, en relación al número de CSC presentes, la expresión de los marcadores CD24 y CD44, de las moléculas de adhesión integrina- α 6 y EpCAM y de los marcadores asociados a la EMT (SNAI1, Twist, Zeb1 y SNAI2).
- 3.2.2. Determinar las funciones asociadas a células *stem* en las mamoesferas inducidas con IL-8, teniendo en cuenta la expresión de los genes asociados a la autorrenovación (Bmi1, GATA3, RUNX1 y HoxB4), reprogramación celular (Nanog, Oct4, Sox2, Klf4), la clonogenicidad, la diferenciación multipotente y la quimioresistencia.
- 3.2.3. Evaluar las capacidades de migración e invasión de las células de las mamoesferas inducidas con IL-8, por su respuesta a los quimioatrayentes SFB, SDF-1, IL-8 y por la presencia de los receptores CXCR1 y CXCR4.
- 3.2.4. Establecer si existe una relación entre la capacidad de migración y la adquisición de funciones *stem*.

4. Marco teórico

4.1. Cáncer de seno.

El cáncer de seno es el segundo cáncer más común en el mundo, y el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres, con un estimado de 2 millones de casos nuevos diagnosticados en el año 2018 (25% de todos los tipos de cáncer diagnosticados en mujeres). Las tasas de incidencia varían en las diferentes regiones del mundo, con tasas que van desde 25.9 por cada 100.000 habitantes en el sur de Asia a 94.2 en Australia/Nueva Zelanda (Bray, Ferlay, Soerjomataram, Rebecca L Siegel, *et al.*, 2018). En Colombia, esta enfermedad se perfila como un problema de salud pública debido a que por su causa fallecen más de 3.700 mujeres anualmente. Se estima que más de 13.000 casos nuevos se detectan cada año. En Colombia su incidencia es de 44.1 por cada 100.000 habitantes, la cual va en aumento (Bray, Ferlay, Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta este escenario, la investigación sobre cáncer de seno es una prioridad a nivel mundial.

El cáncer de seno se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial y heterogénea, que la mayoría de las veces resulta de la transformación maligna de las células epiteliales que componen los ductos (carcinoma ductal) o de las células que componen los lóbulos de la glándula mamaria (carcinoma lobulillar). Las células transformadas inicialmente están confinadas al sitio primario, como resultado de la expresión de moléculas de adhesión, sin embargo, a medida que el tumor progresa, algunas células comienzan a perder estas uniones y a invadir el tejido vecino, lo cual eventualmente desencadena en la invasión de órganos vitales. Hay tumores con presentaciones clínicas y patológicas similares, pero con comportamientos diferentes en relación con su respuesta a los tratamientos. Los sistemas de clasificación tradicionales se basan en las características biológicas del tumor, como el tamaño, el compromiso ganglionar, el grado histológico, la edad del paciente, la presencia del ER, o del receptor de progesterona PR (del inglés, Progesterone Receptor) y el estado (sobrexpresión o amplificación) del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano HER2 (del inglés, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). Estos sistemas de clasificación tienen limitaciones para la aplicación de un tratamiento dirigido, ya que su evaluación puede no ser suficiente para establecer las alteraciones genéticas subyacentes

y los eventos biológicos implicados en el desarrollo y progresión del cáncer. Los estudios recientes se han enfocado en definir los perfiles de expresión génica del tumor para mejorar la estratificación de los pacientes (Yersal and Barutca, 2014).

El subtipo Luminal A es el más común y representa el 50-60% de todos los cánceres de seno, se caracteriza por tener bajo grado histológico, bajo grado de pleomorfismo nuclear, y baja actividad mitótica. Este subtipo se caracteriza por ser ER positivo y/o PR positivo con HER2 negativo y un bajo índice de Ki67 (Carey *et al.*, 2006). Los avances recientes en la investigación del cáncer de seno han permitido la identificación de los subtipos intrínsecos y la caracterización de las células *stem* tumorales (CSC), como responsables de la iniciación del tumor, recurrencia y resistencia a la terapia (Malhotra *et al.*, 2010).

4.2. Senescencia e inflamación.

Los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos para prevenir el crecimiento descontrolado y transformación maligna de las células y desarrollo del cáncer. Uno de estos mecanismos es la senescencia celular, la cual detiene la proliferación de manera irreversible en respuesta a eventos oncogénicos (Bartkova *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2007). Existen varias causas de inducción de senescencia como el acortamiento de los telómeros, daño en el DNA, estrés oxidativo, medicamentos citotóxicos y activación de oncogenes OIS (del inglés, Oncogene-induced senescence— senescencia inducida por oncogenes). Estudios recientes muestran que la OIS se produce durante las primeras etapas del desarrollo del tumor, limitando su progresión. La OIS se describió por primera vez por Lowe y colaboradores, quienes encontraron que una mutación activadora en el oncogén RAS (del inglés, rat sarcoma viral oncogen), generaba células senescentes. El oncogén Ras activo promueve proliferación descontrolada, seguido de la detención del ciclo celular por la activación de p53 y p16 (Serrano *et al.*, 1997).

La senescencia es la principal barrera que debe ser superada por las células malignas para convertirse en células que proliferan sin control. Las células senescentes difieren de su contraparte pre-senescente de dos maneras distintas 1) hay detención del crecimiento y este no puede ser revertido por el uso de mitógenos, y 2) estas células son resistentes a la muerte celular por apoptosis (Campisi, 2000). Si bien hay suficiente evidencia que sugiere

que la respuesta senescente suprime la tumorigénesis, se ha visto que las células tumorales evaden este mecanismo de diferentes maneras (Hollstein *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1994; Shay and Bacchetti, 1997; Foster *et al.*, 1998; Jarrard *et al.*, 1999). Además, también se ha visto que en etapas tardías de la vida la senescencia puede promover el cáncer (Pleiotropía antagonista) (Krtolica *et al.*, 2001). Con la edad las células senescentes se acumulan en los tejidos de roedores, primates y humanos (Davalos *et al.*, 2010).

También se ha mostrado que las células malignas co-transplantadas con células senescentes aumentan el crecimiento celular y la tasa de formación de tumores en modelos de xenotrasplante (Krtolica *et al.*, 2001; Liu and Hornsby, 2007; Bhatia *et al.*, 2008; Bartholomew, Volonte and Galbiati, 2009). También, hay evidencia de la asociación de las células senescentes con etapas premalignas del desarrollo del tumor (Collado, Blasco and Serrano, 2007; Campisi *et al.*, 2011). Más interesante, varios tipos de células premalignas son inducidas a proliferar y formar tumores en presencia de fibroblastos senescentes (Krtolica *et al.*, 2001; Bavik *et al.*, 2006; Castro-Vega *et al.*, 2015), lo que demuestra que el MAT puede ser inducido por un mecanismo dependiente de senescencia, ya sea a través del contacto directo célula-célula o por la secreción de factores de crecimiento tumorales, o indirectamente por la modificación del ambiente en el que las células tumorales se desarrollan.

Las células senescentes son abundantes en las lesiones neoplásicas pre-malignas, y están completamente ausentes en los tumores más avanzados. La asociación de células senescentes con lesiones pre-malignas proporcionan una oportunidad única para usar la senescencia como un indicador de estadios tempranos de la tumorigénesis (Collado and Serrano, 2006). La senescencia está asociada con el envejecimiento. Las células senescentes son metabólicamente activas y expresan un gran número de proteínas algunas de las cuales son secretadas. Este fenotipo, es conocido como “fenotipo secretor asociado con la senescencia” SASP el cual se caracteriza principalmente por un aumento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento, proteasas y factores insolubles (Coppé *et al.*, 2010) que pueden tener un efecto sobre el comportamiento de las células malignas y la progresión tumoral (Davalos *et al.*, 2010). Las células senescentes pueden propagar la respuesta al estrés y afectar el microambiente de las células vecinas (Lasry and Ben-Neriah, 2015). Dentro del microambiente la presencia de proteasas tiene varios efectos: liberación de proteínas asociadas a las membranas

resultando en la presencia de receptores solubles, degradación de moléculas de señalización y degradación de matriz extracelular ECM (del inglés, Extracellular matrix). Estas actividades proporcionan un mecanismo potente por el que las células senescentes pueden modificar el microambiente tisular afectando las células vecinas lo cual puede promover múltiples patologías, incluido el cáncer (Davalos *et al.*, 2010).

Hay una estrecha relación entre la senescencia y la inflamación, las células senescentes activan un tipo único de inflamación, conocido como respuesta inflamatoria senescente SIR (del inglés, Senescence Inflammatory Response), esto a través de la secreción de factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, las cuales promueven el reclutamiento de células del sistema inmune. La SIR tiene dos funciones: una beneficiosa y otra perjudicial para el organismo (Lasry and Ben-Neriah, 2015). En un inicio las células del sistema inmune reclutadas a través de SASP eliminan las células tumorales (Xue *et al.*, 2007). Sin embargo, la exposición prolongada a SASP puede conducir a la supresión del sistema inmune, aumento en la proliferación celular, la angiogénesis e invasión tumoral (Coppé *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2008). La inflamación crónica está relacionada con estrés oxidativo, el cual causa daño en el DNA contribuyendo con la acumulación de alteraciones genéticas en las células (Ren *et al.*, 2009).

Además, se cree que los efectos de SASP pueden ser muchos más complejos *in vivo*, debido a su impacto en las células del estroma, células inmunes, inflamatorias y otros. La composición de SASP varía dependiendo de la célula y el tejido de origen y los factores desencadenantes involucrados; sin embargo, las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 están siempre presentes y parecen ser responsables del mantenimiento y la propagación de la respuesta inflamatoria/senescente en el MAT (Coppé *et al.*, 2008, 2010). Los niveles séricos elevados de ambas citoquinas se han utilizado de forma independiente como marcadores de mal pronóstico para el cáncer de seno (Bachelot *et al.*, 2003; Benoy *et al.*, 2004; Knüpfner and Preiß, 2007; Yao, Lin, Ye, *et al.*, 2007), lo que señala su importancia en la biología tumoral. La inflamación tiene un rol dual en la patogénesis del cáncer. La respuesta inflamatoria puede eliminar las células potencialmente tumorales, sin embargo el microambiente inflamatorio también puede promover el desarrollo del cáncer (Ren *et al.*, 2009). La inflamación crónica provee un microambiente que promueve el desarrollo del cáncer de varias formas (Schäfer and Werner, 2008). A este respecto se ha estudiado en particular el efecto de la IL-6. Se ha demostrado que la IL-6 desempeña un papel central en

el equilibrio dinámico entre CSC y no-CSC, en el mantenimiento y el enriquecimiento de mamoesferas normales y malignas, (Sansone *et al.*, 2007; Iliopoulos *et al.*, 2011; Korkaya *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013).

4.2.1. Interleuquina 8 (IL-8).

La Interleuquina 8 (IL-8), también conocida como CXCL8, es un miembro de la familia de quimioquinas CXC, la cual puede ser producida por una variedad de tipos celulares. Inicialmente fue identificada como un factor quimiotáctico y activador de neutrófilos. Tiene múltiples roles como citoquina inflamatoria mediando la activación y quimiotaxis de varios tipos de células inmunes. Presenta especificidad alta por los neutrófilos atrayéndolos y activándolos en regiones de inflamación, promoviendo su quimiotaxis y degranulación (Bickel, 1993). En condiciones en la que es expresada de manera aberrante puede desencadenar inflamación crónica (Palena, Hamilton and Fernando, 2012). Las fuentes principales de esta quimioquina son los monocitos y células endoteliales, quienes secretan IL-8 en respuesta a varios estímulos: Factor de necrosis tumoral α TNF- α (del inglés, Tumor necrosis factor α) e Interleuquina 1 (IL-1 β). Otros tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos y células tumorales pueden secretar IL-8 en condiciones de estrés como hipoxia, exposición a agentes quimioterapéuticos, y hormonas (andrógenos, estrógenos y dexametasona) (Waugh and Wilson, 2008; Palena, Hamilton and Fernando, 2012).

La IL-8 puede activar múltiples vías de señalización a través de su unión a los receptores acoplados a proteínas G (CXCR1 y CXCR2). Estos receptores comparten características estructurales similares, lo que sugiere que los genes que los codifican se generaron por duplicación génica. Después de la activación de las proteínas G heterotriméricas, la señalización de IL-8 promueve la activación de los efectores primarios: la fosfatidil-inositol-3 quinasa y la fosfolipasa C, promoviendo la activación de AKT, PKC, e induciendo la movilización de calcio que resulta en la activación de las cascadas de señalización de las MAPK. Estas vías de señalización promueven la síntesis de proteínas y la regulación de la actividad de varios FTs. Adicionalmente, la IL-8 promueve la translocación al núcleo de STAT3 y β -catenina.

En el contexto del tumor, la IL-8 participa en la progresión del cáncer por la promoción de la respuesta angiogénica por parte de las células endoteliales, el reclutamiento de varias

poblaciones inmunes en el tumor, y la proliferación, supervivencia y migración de las células tumorales (Waugh and Wilson, 2008; Palena, Hamilton and Fernando, 2012). Recientemente se ha demostrado en cáncer de páncreas, pulmón y de seno la relación que existe entre la IL-8, la EMT y la adquisición de funciones *stem* (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017) (Fernando *et al.*, 2010). El eje IL-8–CXCR1 juega un rol importante en el mantenimiento de las CSC en cáncer de seno. Estudios recientes han demostrado que la adición de IL-8 a células de cáncer de seno aumenta el porcentaje de células aldehído deshidrogenasa positivas, así como aumenta la capacidad de migración e invasión *in vitro* (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009).

Se ha observado la sobre-expresión de IL-8 y sus receptores en células tumorales, neutrófilos, y macrófagos asociados al tumor, lo que sugiere que IL-8 puede funcionar como un factor regulador dentro del MAT (Waugh and Wilson, 2008). La IL-8 se ha estudiado no sólo por su papel como quimioquina en la invasión del cáncer y la metástasis (Lin *et al.*, 2004; Waugh and Wilson, 2008) sino también por su capacidad de regular las CSC en tumores de seno HER+ (Singh *et al.*, 2013) y la formación de mamoesferas en varias líneas celulares de diferentes orígenes (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009).

Análisis de perfiles genéticos de líneas celulares de cáncer de seno han mostrado que las poblaciones ALDEFLUOR+ sobre-expresan el receptor CXCR1 y que la adición de IL-8 recombinante aumenta la población de CSC. El bloqueo de CXCR1 elimina selectivamente la población de CSC, seguido de la inducción masiva de apoptosis en las células de la masa tumoral a través de la señalización de FASL/FAS. La producción de FASL es mediada por la ruta FAK/AKT/FOXO3A (Ginestier *et al.*, 2010). AKT promueve la inactivación de FOXO3A mediante su fosforilación en tres residuos serina/treonina los cuales promueven la translocación de FOXO3A al citoplasma donde es blanco de ubiquitinación y degradación, bajos niveles de FOXO3A promueven el fenotipo de CSC (Greer and Brunet, 2005). La activación de FOXO3A resulta en una disminución en el potencial para iniciar tumores (Smit *et al.*, 2016).

Estos hallazgos y otros, como se explicó antes, han puesto de manifiesto la estrecha relación entre la senescencia y la inflamación (Lasry and Ben-Neriah, 2015), y la relevancia de la cronicidad de ambos fenómenos en la progresión tumoral. Por ejemplo, la exposición prolongada a SASP puede aumentar la progresión del tumor (Krtolica *et al.*, 2001; Bavik *et*

al., 2006) y la inflamación crónica puede aumentar el riesgo de cáncer actuando como un estímulo promotor de tumores (Balkwill, Charles and Mantovani, 2005). A este respecto, se ha visto que el uso de NSAIDs (del inglés, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios, disminuye la recurrencia y mortalidad no solo en el cáncer colorrectal (Rothwell *et al.*, 2011) sino también en cáncer de seno y páncreas, sugiriendo un mecanismo de acción común de los mediadores de la inflamación en el desarrollo y progresión tumoral (Fraser *et al.*, 2014; Streicher *et al.*, 2014). En particular en trabajos del grupo en cooperación con el Instituto Curie en Paris, hemos mostrado que el MeCoSe de fibroblastos senescentes es capaz de inducir la EMT, y la aparición de células con características de células *stem* (células con capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotente) dos programas biológicos necesarios para el desarrollo y crecimiento tumoral (Castro-Vega *et al.*, 2015).

4.3. Transición epitelio-mesenquimal (EMT).

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un programa biológico altamente conservado, que cuando es ejecutado de manera completa, promueve la transición de un fenotipo epitelial inmóvil a un fenotipo mesenquimal móvil (Dongre and Weinberg, 2019). La EMT es importante durante el desarrollo embrionario, la curación de heridas, la regulación de las células *stem*, la fibrosis y la progresión del cáncer (Lamouille *et al.*, 2014). Se ha clasificado en 3 tipos. El tipo 1, ocurre en la embriogénesis temprana (gastrulación y migración de la cresta neural), hay una transición de las células epiteliales primitivas a células mesenquimales móviles. El tipo 2, involucra células endoteliales y epiteliales secundarias, las cuales hacen una transición a fibroblastos residentes, esta ocurre por la expresión local de citoquinas que dirigen su transición, este tipo de transición está asociado con la curación de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis en los órganos. El tipo 3, involucra las células epiteliales tumorales, las cuales tienen la capacidad de realizar la EMT, favoreciendo la invasión y la metástasis. Aunque estos tres tipos de EMT representan procesos biológicos diferentes, algunos mecanismos de regulación y elementos genéticos son bien conservados entre ellos. Esto sugiere que este programa importante durante el desarrollo puede ser cooptado por las células tumorales durante la metástasis o la recurrencia de tumor (Wang and Zhou, 2013). En las neoplasias la EMT les confiere a las células tumorales una capacidad aumentada de iniciación de tumores, mayor potencial metastásico y resistencia a agentes quimioterapéuticos (Dongre and Weinberg, 2019), esto hace que el diseño de

terapias efectivas sea un gran desafío. Sin embargo, hoy se sabe que este no es un proceso binario entre los dos estados. La EMT es un conjunto de múltiples estados de transición entre el fenotipo epitelial y mesenquimal, donde las células se mueven a través de todo un espectro de fases intermedias, haciendo que las células frecuentemente realicen la EMT de manera parcial (EMT-parcial), mostrando fenotipos híbridos. Las células con fenotipos híbridos se conocen como células “metaestables”, refiriéndose a la flexibilidad de estas células para inducir o reversar la EMT (Nieto *et al.*, 2016). La EMT y sus estados intermedios han sido identificados como conductores cruciales de la progresión tumoral. Recientemente se ha sugerido que para que ocurra la progresión tumoral y la metástasis es necesario que la activación de la EMT sea un proceso transitorio y reversible (Kröger *et al.*, 2019).

En las neoplasias específicamente en los carcinomas se ha observado que la heterogeneidad presente en los tumores se debe a la activación de la EMT. Este programa biológico promueve la plasticidad celular, donde las células tumorales pueden cambiar de un estado a otro dentro del espectro epitelial-mesenquimal (Kröger *et al.*, 2019).

En los tejidos las células epiteliales se mantienen unidas lateralmente mediante uniones estrechas y uniones adherentes. Las uniones adherentes se caracterizan por estar formadas por moléculas de cadherina epitelial (E-cadherina). Estas uniones son cruciales para la integridad estructural del tejido epitelial (Dongre and Weinberg, 2019). Durante la EMT, las células epiteliales pierden, reubican y/o degradan proteínas involucradas en las uniones célula-célula, pierden la polaridad apical-basal, reorganizan su citoesqueleto y reprograman la expresión génica (Lamouille *et al.*, 2014). Esta transición se caracteriza adicionalmente por la disminución en la expresión de citoqueratinas epiteliales (citoqueratina 8 y 18), la disolución de las uniones estrechas acompañada por la disminución de claudinas, ocludinas y difusión de las uniones ocluyentes (ZO1), además disminución en la expresión de la E-cadherina (Hollier *et al.*, 2009) (Lamouille, Xu and Derynck, 2014). La disminución en la expresión de la E-cadherina es balanceada por el aumento en la expresión de N-cadherina, quien a su vez activa la expresión de la molécula de adhesión neural N-CAM. La composición de los filamentos estrechos cambia activándose la expresión de la vimentina (filamento que regula el tráfico de los organelos, las proteínas asociadas a la membrana y la interacción con proteínas motoras), adicionalmente aumenta la expresión de la actina del musculo liso SMA (del inglés, Smooth-

Muscle Actin), la fibronectina y metaloproteinasas (Lamouille, Xu and Derynck, 2014) (Thiery *et al.*, 2009).

La EMT usualmente no es activada como un proceso autónomo en las células tumorales. Las señales de un estroma reactivo asociado al tumor actúan sobre las células tumorales induciendo la expresión de FTs asociados con la EMT, los cuales dirigen la expresión de varios componentes de este programa. Este proceso es entonces ejecutado en respuesta a factores de señalización pleiotrópicos, los cuales inducen la expresión de FTs como: SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug), Twist-related protein 1 (TWIST1), TWIST2, zinc-finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) y ZEB2 entre otros (Nieto *et al.*, 2016) (Stemmler *et al.*, 2019).

Varias rutas de señalización están involucradas en la regulación de la EMT, así como los FTs mencionados anteriormente, los cuales responden a diferentes estímulos del microambiente, funcionando como interruptores maestros del programa de EMT (Nieto, 2002), (Yang *et al.*, 2004). Estos FTs se pueden unir al E-box del promotor de la E-cadherina, reclutando correpresores transcripcionales e histonas desacetilasas para el silenciamiento de la E-cadherina (Pardali and Moustakas, 2007). SNAI1 es el efector más estudiado de la represión de la E-cadherina y la EMT. Adicionalmente, SNAI1 está involucrado en la regulación a la baja de otras moléculas epiteliales como: claudinas, ocludinas y mucina-1, además de inducir la expresión de genes asociados con el fenotipo mesenquimal (Wu and Zhou, 2010). Por otro lado se han observado altos niveles de expresión de SNAI1 en células epiteliales y endoteliales de cáncer de seno invasivo (Martin *et al.*, 2005).

SNAI2 (Slug) es un FTs de tipo C2H2, así como un marcador de EMT que ha sido identificado en cáncer de colon y ovario, y cuya presencia se correlaciona con un mal pronóstico clínico (Camp *et al.*, 2011) (Haslehurst *et al.*, 2012). SNAI2 es un regulador maestro de la actividad de reconstitución de la glándula mamaria por las células *stem* normales, la expresión forzada de SNAI2 y Sox9 en células tumorales de cáncer de seno puede inducir de manera eficiente células iniciadoras de tumores TICs (del inglés, Tumor-Initiating Cells) (Guo *et al.*, 2012). SNAI2 se une directamente a la caja E del promotor del receptor de estrógenos ER α disminuyendo su síntesis y contribuyendo a la quimiorresistencia (Li *et al.*, 2015).

La transformación de las células tumorales en células metastásicas se da por alteraciones genéticas y epigenéticas (factores intrínsecos), así como por un microambiente caótico (señales extrínsecas). Es un reto para la investigación actual identificar los factores intrínsecos y las señales extrínsecas que promueven la metástasis en el cáncer de seno (Wang and Zhou, 2013). La EMT promueve la disociación de las células del tumor primario seguido de la migración y diseminación a lugares distantes (Nieto *et al.*, 2016). Una vez la célula ha migrado a través del torrente sanguíneo y alcanzado su destino final, se induce la transición mesénquimo-epitelial MET (del inglés, Mesenchymal-Epithelial Transition) (Zeisberg and Neilson, 2009). La MET induce el cese de la migración, la inducción de la proliferación celular y la formación de un nuevo tumor (Nieto *et al.*, 2016). La MET es asociada con pérdida de libertad migratoria, polarización apical-basal y expresión de moléculas de adhesión (Nieto *et al.*, 2016). Siendo la EMT un proceso transitorio y reversible (Hollier, Evans and Mani, 2009). La habilidad de las células epiteliales en realizar la transición a células mesenquimales y retornar ya sea de manera parcial o completa muestra la plasticidad inherente del fenotipo epitelial (Lamouille *et al.*, 2014).

Recientemente se demostró una conexión entre la EMT y las CSC. La EMT facilita la generación de células tumorales con rasgos mesenquimales, los cuales son requeridos para su diseminación, así como propiedades de autorrenovación capacidad necesaria para iniciar tumores secundarios (Hollier, Evans and Mani, 2009). La inducción de la EMT en células epiteliales de la glándula mamaria inmortalizadas se da por la expresión ectópica de SNAI1 o TWIST, o la exposición a TGF- β , esta inducción de la EMT se traduce en una mayor capacidad de formar mamoesferas y expresión de CD44+/CD24-. Bajo estos estímulos las células adoptan un fenotipo mesenquimal (Mani *et al.*, 2008) (Morel *et al.*, 2008). Esta evidencia sugiere una posible conexión entre la EMT y la adquisición de propiedades de CSC.

4.3.1. Fenotipo híbrido.

La transición de las células tumorales entre el fenotipo mesenquimal y epitelial son características claves en la metástasis. Durante la transición entre estos fenotipos, las células pueden presentar un fenotipo híbrido, es decir una EMT parcial o intermedia. Las células con este fenotipo presentan rasgos mixtos tanto epiteliales como mesenquimales (Jolly *et al.*, 2015). Aunque por algún tiempo se ha considerado que las células con un

fenotipo mesenquimal son las que presentan mayores propiedades *stem*, investigaciones recientes han propuesto que las células con fenotipo híbrido son las que presentan mayores propiedades *stem*. Las células que residen en el fenotipo híbrido presentan mayor capacidad de invasión, capacidad de iniciar tumores y diseminación metastásica (Kröger *et al.*, 2019). Estudios recientes sugieren que la presencia del fenotipo híbrido permite a las células tumorales moverse colectivamente, lo cual le da una ventaja con respecto a células que migran de manera individual, permitiendo la colonización de tejidos distantes (Jolly *et al.*, 2015).

4.3.2. Rutas de señalización asociadas a la EMT.

Varias rutas de señalización gobiernan la activación de la EMT y sus fenotipos asociados. Ligandos como TGF- β y Wnt presentes en el microambiente pueden trabajar en conjunto provocando la expresión de varios factores de transcripción asociados a la EMT como ZEB1, TWIST y SNAIL. Los ligandos Wnt pueden activar la ruta Wnt canónica dependiente de β -catenina o la ruta Wnt no-canónica independiente de β -catenina. La ruta canónica es activada preferencialmente en las células *stem*, mientras que la ruta no canónica es preferencialmente activada en procesos de migración e invasión.

La ruta no canónica se divide en dos rutas adicionales: la ruta de polaridad celular planar PCP (del inglés, Planar Cell Polarity) y la ruta dependiente del calcio. La activación de una u otra ruta de señalización depende del contexto celular, el tipo de ligando Wnt (Wnt5A, Wnt7A y Wnt7B) los co-receptores y los receptores presentes en las células (Kröger *et al.*, 2019).

Se ha establecido que el fenotipo híbrido es dirigido por el factor de transcripción SNAIL y la ruta de señalización Wnt canónica. Diferente a lo que ocurre en las células con fenotipo mesenquimal, donde la ruta de señalización Wnt no canónica y ZEB1 son las que dirigen el mantenimiento de este fenotipo (Kröger *et al.*, 2019).

4.4. Células *stem* tumorales CSC.

Los tumores sólidos derivados de células epiteliales representan el 80% de todos los tipos de cáncer. Estos tumores se caracterizan clínicamente por el grado histológico y por la expresión de marcadores específicos, que asociados con perfiles de expresión ha permitido la definición de distintos subtipos tumorales (Visvader and Lindeman, 2008). Una característica importante de las células tumorales es su capacidad para invadir tejidos circundantes y realizar metástasis a órganos distantes. Sin embargo, se conoce que no todas las células que componen el tumor tienen estas capacidades. Se ha determinado que los tumores se inician y mantienen por un subcomponente celular minoritario que muestra propiedades de células *stem*, es decir capacidad de autorrenovación, la cual dirige la tumorigénesis, y capacidad de diferenciación (aberrante), la cual contribuye con la heterogeneidad celular presente en el tumor. El inicio de la investigación sobre las células *stem* se dio en los años 90 en el laboratorio de John Dick's (Lapidot *et al.*, 1992). A partir de los conocimientos previos sobre la biología de las células *stem* hematopoyéticas normales, estos investigadores identificaron una subpoblación de células en leucemia mieloide aguda (LMA) con fenotipo CD34⁺CD38⁻ las cuales tenían la capacidad de propagarse en cultivo y generar leucemia en ratones inmunocomprometidos SCID (del inglés – *severe combined immune deficient mice*). Con el ensayo de dilución limitante se estimó que la frecuencia de células *stem* era de 1 en 250.000 células de LMA. En contraste cuando xenotrasplantaron células de leucemia que expresaban el fenotipo CD38⁺, encontraron que estas células eran incapaces de causar LMA en estos ratones. Estos hallazgos en conjunto mostraron que había presencia de células *stem* en la LMA, y que había una organización aparentemente jerárquica entre ellas, y que estas células *stem* tenían la capacidad de generar progenie tumoral diferenciada (Lapidot *et al.*, 1994). Las células iniciadoras de leucemia tenían capacidad de diferenciación y potencial de autorrenovación similares a las células *stem* leucémicas (Bonnet and Dick, 1997).

La primera identificación de CSC en tumores sólidos surgió del trabajo de Al-Hajj et al, quien a partir de efusiones pleurales y tumores primarios de seno provenientes de pacientes, aisló células con el fenotipo EpCAM⁺CD44⁺CD24^{-low}Lin⁻, las cuales tenían capacidad de formar tumores cuando eran inyectadas en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NOD/SCID (del inglés- *non-obese diabetic/severe combined immune deficiency*), células con otro fenotipo no tenían la capacidad para iniciar tumores (Al-Hajj *et al.*, 2003).

La existencia de CSC también ha sido descrita en otros tumores sólidos que incluyen cerebro, colon, páncreas, pulmón, hígado, cabeza y cuello (Visvader and Lindeman, 2008). Se ha establecido que las CSC además de conducir la tumorigénesis, también contribuyen con la metástasis y la recurrencia después de tratamiento (T Reya *et al.*, 2001).

La definición de las CSC se basa en tres características funcionales que poseen estas células: 1) Habilidad de iniciar tumores en ratones inmunocomprometidos, 2) autorrenovación medida por la capacidad de formar tumores en ratones secundarios y 3) capacidad de diferenciarse en las células que componen la masa tumoral (células no *stem*) (McDermott and Wicha, 2010). Otras características importantes de las CSC son su resistencia a la radioterapia y la quimioterapia (Akrap *et al.*, 2016). Siendo las CSC las responsables de la iniciación tumoral, mantenimiento y recaída después del tratamiento con quimioterapia y radioterapia convencional.

4.4.1. Marcadores de superficie de CSC.

En el cáncer de seno, una expresión elevada de CD44 y baja de CD24 (CD44⁺/CD24^{-/Low}), se ha asociado con características de células *stem* (Li *et al.*, 2017). CD44 es una proteína transmembranal que tiene un papel importante en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. CD44 se une principalmente al ácido hialurónico HA (del inglés - hyaluronan), sin embargo existen otros ligandos que incluyen colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, condroitin sulfato, complejo mayor de histocompatibilidad II entre otros (Naor *et al.*, 2002). CD44 es expresado ampliamente en las células del cuerpo y sus ligandos son comunes, la unión exitosa de CD44 a sus ligandos dependerá de los estímulos externos. El splicing alternativo y la glicosilación de la proteína dan lugar a múltiples isoformas que difieren en tamaño (85-230 kDa), funcionalidad y localización en el tejido (Naor *et al.*, 2002). Se han identificado 3 estados de CD44: activo, inducible e inactivo. La actividad se define por el estado de glicosilación de la proteína. El estado activo tiene menor glicosilación y une constitutivamente al HA, el estado inducible está moderadamente glicosilado y necesita ser activado por anticuerpos monoclonales, citoquinas, factores de crecimiento, o esteroides de forbol, y el estado inactivo es el más glicosilado donde CD44 es incapaz de unirse a HA (Naor *et al.*, 2002). Generando una diversidad de isoformas, la isoforma estándar de CD44s es la más pequeña (37kDa no glicosilada, 80-100 kDa glicosilada) y fue identificada primero en células hematopoyéticas, luego en la epidermis,

hígado, páncreas, pulmón y sistema nervioso central. Las isoformas variables CD44v parecen estar más restringidas a los tejidos (Naor *et al.*, 2002).

CD44 actúa en la tumorigénesis por: inducción de señales de crecimiento, favorecimiento de la degradación de la matriz extracelular y la lámina basal permitiendo la migración y la expansión tumoral. CD44 también interactúa con las metaloproteinasas, activándolas y luego uniéndolas a la superficie de las células tumorales (Herrera-Gayol and Jothy, 1999)(Sneath and Mangham, 1998).

CD24 también conocido como antígeno termoestable HAS (del inglés, Heat stable antigen), es una sialoproteína que aumenta la adhesión celular, la proliferación y la metástasis. La expresión de este marcador es muy baja o ausente en las CSC. Estudios *in vitro* demostraron que la sobreexpresión de esta proteína inhibe las propiedades *stem* de las células tumorales (Crabtree and Miele, 2018). Sin embargo, a este respecto hay estudios con hallazgos diferentes, donde las células CD24^{Pos} presentaron fenotipos más mesenquimales, propiedades *stem* y una firma de expresión génica proinflamatoria (Ortiz-Montero *et al.*, 2018).

Adicional a estos dos marcadores, la molécula de adhesión EpCAM y la integrina $\alpha 6$ (CD49f) se han utilizado para la clasificación de las células de la glándula mamaria en células progenitoras y células luminales diferenciadas (Cariati *et al.*, 2008) (Hiraga, Ito and Nakamura, 2016). CD49f es una integrina que se homodimeriza con otras integrinas como CD24 o CD104 para unir laminina y facilitar la adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular (ECM). Esta integrina es importante en la transducción de señales lo que facilita la comunicación entre las células y la ECM. La expresión de esta proteína se asocia con un mal pronóstico y una supervivencia reducida en cáncer de seno (Crabtree and Miele, 2018). EpCAM (del inglés, Epithelial Cell Adhesion Molecule) es una glicoproteína transmembranal tipo I, altamente expresada en cáncer de colon, próstata y seno. EpCAM se encuentra en la membrana basolateral de la mayoría de tejidos epiteliales siendo importante en la adhesión célula-célula (Osta *et al.*, 2004).

Otro marcador usado para caracterizar las células con propiedades *stem*, es la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH1), la cual cataliza la oxidación de los aldehídos intracelulares y tiene un papel en la diferenciación de CSC de seno a través de la oxidación

del retinol a ácido retinoico. Una alta actividad de esta enzima permite identificar las CSC. Su expresión se asocia con un mal pronóstico y subtipos de cáncer de seno triple negativos (Crabtree and Miele, 2018).

La E-cadherina es una molécula de adhesión dependiente de calcio que se expresa en las uniones adherentes (Younis, El Sakka and Haque, 2007), permitiendo la unión célula-célula, su pérdida se asocia con la EMT. Se cree que la E-cadherina tiene propiedades supresoras de tumores donde la pérdida se asocia con carcinogénesis e invasión (Horne *et al.*, 2018).

La caracterización exacta de las CSC es fundamental para su identificación, monitoreo y aplicación de terapias dirigidas contra ellas. Sin embargo, elegir terapias cuyo blanco sean las CSC que involucren rutas de señalización relacionadas con procesos de autorrenovación y supervivencia son limitadas. Las CSC cooptan funciones de las células *stem* normales lo cual dificulta su eliminación causando toxicidad sistémica (Ginestier *et al.*, 2010).

4.4.2. Anoikis.

La anoikis es un tipo de muerte celular programada inducida en las células por la ausencia de unión a la ECM, pérdida de adhesión célula-célula o por la adhesión de las células en una localización que no corresponde con su tejido de origen. Las células censan su localización a través de su interacción con la ECM y con las células vecinas. La anoikis previene el crecimiento celular independiente de anclaje, así como el crecimiento en una ECM inapropiada, evitando así la colonización de órganos distantes (Gilmore, 2005).

Durante la progresión del cáncer, las células tumorales adquieren características asociadas con la resistencia a la anoikis a través de varios mecanismos: cambio en el repertorio de las integrinas lo cual les permite crecer en nichos diferentes, activación de señales anti-apoptóticas, activación oncogénica, y sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, entre otros. La anoikis garantiza el correcto desarrollo de los tejidos y su homeostasis, siendo una defensa importante para evitar la adhesión de las células a nuevas ECM en ubicaciones incorrectas. La falta de ejecución de este programa puede llevar a que

las células puedan sobrevivir en suspensión (ausencia de anclaje) y proliferen en sitios ectópicos diferentes de los originales, promoviendo la formación de metástasis en órganos distantes (Paoli, Giannoni and Chiarugi, 2013).

La ECM está compuesta por proteoglicanos, colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, laminina y proteínas, las cuales sirven de andamio para las células. Su composición depende del tipo de tejido, lo cual le da especificidad al tipo celular residente. Los componentes de la ECM son secretados principalmente por los fibroblastos. Además de conferirle especificidad a los tejidos, la ECM es una fuente importante de factores de crecimiento (Boffetta and Hainaut, 2018).

La unión de las células a la ECM está mediada por los receptores transmembranales de la familia de las integrinas, los cuales son esenciales para suprimir la anoikis. Las integrinas a través de la unión con la ECM activan rutas de señalización de supervivencia (Gilmore, 2005). La iniciación y ejecución de la anoikis puede ser dirigida por la ruta intrínseca o extrínseca de la apoptosis que convergen en la activación de las caspasas y fragmentación del DNA. Estudios recientes han demostrado que las células tumorales son resistentes a la anoikis y no requieren la adhesión a la ECM para sobrevivir y proliferar. Esta habilidad tiene importantes implicaciones en los procesos metastásicos donde las células tumorales sobreviven y migran en ausencia de contactos apropiados con la ECM. En este escenario, la resistencia a la anoikis es un prerrequisito para la diseminación del cáncer (Taddei *et al.*, 2012).

4.5. Microambiente tumoral (MAT).

El MAT es un medio complejo compuesto por diferentes tipos celulares (células estromales, inmunes, endoteliales, epiteliales, musculares, nerviosas), matriz extracelular, y factores solubles, conformando un nicho, el cual promueve el crecimiento, mantenimiento y diferenciación de las CSC, así como de las células más diferenciadas. Redes de señalización intracelular entre las no-CSC, las CSC y el MAT modulan y promueven la

adquisición de propiedades *stem* la plasticidad celular, las transiciones EMT-MET, y la metástasis (Chaffer et al., 2011) (Plaks et al., 2015).

En el tejido sano, la identidad celular y la homeostasis son controladas estrechamente no solo por mecanismos autónomos de la célula sino también por el MAT. Fallas en la preservación de la estabilidad del tejido puede resultar en transformaciones neoplásicas (Hanahan & Weinberg, 2011).

La interacción entre las células tumorales y el estroma asociado influye de manera importante en la iniciación y progresión del cáncer (Quail and Joyce, 2013). En 1863 Rudolf Virchow propuso la existencia de una relación entre la inflamación crónica y la tumorigénesis (Quail and Joyce, 2013). El estroma asociado a los tumores de alto grado es muy similar al estroma de tejidos epiteliales normales durante la inflamación y la curación de heridas. Los principales componentes del estroma son los macrófagos y los fibroblastos asociados a los tumores TAM (del inglés, Tumor-Associated Macrophage) y CAF (del inglés, Cancer-Associated Fibroblast).

El origen de los TAM es diverso, pueden ser residentes del tejido o derivados de reservorios periféricos como la médula ósea y el bazo. Su rol más importante es en la periferia del tumor donde impulsan fenotipos invasivos. Estudios en cáncer de seno y glioma han demostrado que los TAM facilitan la invasión de las células tumorales a través de un bucle de señalización paracrina que involucra el factor estimulante de colonias derivado del tumor CSF-1 (del inglés, Colony-stimulating factor 1) y el factor de crecimiento epidérmico derivado de los macrófagos EGF (del inglés, Epidermal Growth Factor). Además los TAM son una fuente importante de proteasas, como las catepsinas de cisteína, las cuales promueven la progresión tumoral y la resistencia terapéutica (Quail and Joyce, 2013).

Dentro del MAT los fibroblastos juegan un papel importante. Los fibroblastos normales procedentes de mamoplastias de reducción retienen la morfología epitelial de las células de la glándula mamaria, mientras que el co-cultivo de las células epiteliales con los fibroblastos asociados a tumores CAF promueven morfología mesenquimal (Dumont et al., 2013). Adicionalmente, se ha observado que en cáncer colorrectal los CAF secretan el factor de crecimiento de hepatocitos HGF (del inglés, Hepatocyte Growth Factor) el cual mantiene la función de las CSC por la activación de la ruta de señalización Wnt (Chen &

Huang., 2014). El HGF, un potente inductor de la EMT, puede inducir funciones tipo *stem* en células diferenciadas (Visvader & Lindeman., 2012). La interacción entre las no-CSC, las CSC y MAT es bidireccional, el MAT regula el comportamiento celular, y las células presentes a su vez modifican el MAT (Rich., 2016).

Se conoce que además de las células del estroma, las células tumorales que han sufrido la EMT aumentan la secreción de factores específicos, incluidos citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, los cuales pueden jugar un papel importante en la progresión tumoral además del mantenimiento de la heterogeneidad. Las células que componen el MT son fuente de factores solubles capaces de inducir EMT en las células vecinas. Adicionalmente las células tumorales también pueden producir citoquinas, factores de crecimiento y mediadores solubles los cuales pueden reprogramar el estroma circundante en respuesta a condiciones de estrés como la hipoxia o la exposición a agentes quimioterapéuticos (Palena et al., 2012). Dos citoquinas importantes son la interleuquina IL-6 y la IL-8, las cuales junto con su receptor están involucradas en el mantenimiento y la regulación de las CSC (Xie et al., 2012) (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017) (Palena et al., 2012).

IL-8 desempeña múltiples funciones como citoquina proinflamatoria, media la activación y la quimiotaxis de diversos tipos de células inmunes, y puede conducir a estados inflamatorios crónicos si se expresa de manera aberrante. Una vez secretada, la actividad de IL-8 depende de su unión a CXCR1 y CXCR2, que se expresa principalmente en neutrófilos, monocitos, células endoteliales y algunas células tumorales. En el contexto del tumor IL-8 participa en la progresión del cáncer promoviendo la respuesta angiogénica de las células endoteliales, el reclutamiento de neutrófilos en el sitio del tumor y la proliferación, supervivencia y migración de las células tumorales (Palena et al., 2012).

En los últimos años se ha demostrado que existe un vínculo entre IL-6 e IL-8, la EMT y la adquisición de propiedades *stem* (Palena et al., 2012) (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017). Esto muestra entonces que el MT puede regular la plasticidad intra-tumoral. En el cáncer de seno se ha evidenciado que en el MAT existen tres componentes importantes: 1) Hormonal – estrógeno, 2) Inflamatorio – Factor de necrosis tumoral TNF α (del inglés, Tumor Necrosis Factor α), y 3) Estimulación del crecimiento – Factor de crecimiento epidérmico EGF (del inglés, Epidermal Growth Factor). La estimulación de

células del subtipo Luminal A con estrógeno+TNF α +EGF induce un mayor potencial metastásico, adquisición de fenotipos asociados a EMT y enriquecimiento de poblaciones asociadas a células tipo *stem* (CD44⁺/CD24^{low/-}) (Weitzenfeld et al., 2016).

Los fibroblastos son la población celular más abundante en el tejido conectivo, se caracterizan por tener múltiples funciones, entre ellas, deposición de los componentes de la matriz extracelular y la membrana basal, regulación de los procesos de diferenciación de las células epiteliales, modulación de la respuesta inmune y mantenimiento de la homeostasis en los tejidos (Quail and Joyce, 2013). En el MAT se encuentran los CAFs, los cuales están presentes en una alta proporción y se diferencian funcionalmente de los fibroblastos normales. Los CAFs son una fuente importante de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias las cuales son esenciales para la tumorigénesis (Quail and Joyce, 2013).

Cuando se co-inyectan células epiteliales normales de próstata con CAFs en ratones se originan neoplasias intraepiteliales, contrario a lo que ocurre cuando se co-inyectan estas mismas células con fibroblastos normales, donde hay ausencia completa de neoplasia (Olumi *et al.*, 1999). De manera similar ocurre en el cáncer de seno, donde los CAFs le confieren fenotipo mesenquimal a las células epiteliales premalignas y malignas, promoviendo la metástasis, mientras que los fibroblastos normales promueven un fenotipo epitelial suprimiendo la metástasis (Dumont *et al.*, 2013). Estos estudios indican que los CAFs deben considerarse un tipo celular completamente diferente a los fibroblastos normales, los cuales tienen efectos potentes en la tumorigénesis. Una vez los CAFs se acumulan en MAT, son activados por factores de crecimiento y citoquinas, como TGF- β , proteína quimiotáctica de monocitos MCP1 (del inglés Monocyte Chemotactic Protein), factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (del inglés Platelet-Derived Growth Factor), factor de crecimiento de fibroblastos FGF (del inglés Fibroblast Growth Factor) y proteasas (Quail and Joyce, 2013).

Después de su activación, los CAFs son la mayor fuente de factores de crecimiento que soportan la tumorigénesis. Los CAFs secretan factor de crecimiento vascular-endotelial VEGF (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor), factor importante en la inducción de la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Fukumura *et al.*, 1998).

5. Metodología

5.1. Cultivo línea celular de cáncer de seno MCF-7

La línea celular MCF-7 (HTB-22) se obtuvo de la ATCC. Las células se cultivaron en medio RPMI1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado con calor en condiciones estándar de cultivo. Células frescas fueron descongeladas periódicamente (3-4 meses) para los distintos experimentos. Para los pases se realizó tratamiento con tripsina-EDTA (0.25% TRIPSINA, 0.5 mM EDTA) durante 5 min a 37°C. El registro fotográfico se realizó con una cámara acoplada a un microscopio de luz.

5.2. Tratamiento de las células MCF-7 con IL-8.

Las células MCF-7 se cultivaron a una densidad de 1×10^5 células/ml hasta que alcanzaron una confluencia del 40%, se lavaron con PBS 1X, y luego se dejaron en medio RPMI 1640 sin suero durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se adicionaron 50 ng/ml de IL-8 recombinante (PHC0084, Invitrogen) en medio RPMI 1640 con SFB al 0.5%. En estas condiciones fueron cultivadas las células durante 5 días. Se adicionaron 50 ng/ml de IL-8 y SFB al 0.5% cada dos días. Las células MCF-7 cultivadas en RPMI 1640 con SFB al 0.5% fueron usadas como control. Después de este período, las células fueron tripsinizadas, lavadas y contadas en cámara de Neubauer para el ensayo de formación de mamoesferas.

Condiciones experimentales:

Control: células MCF-7 + medio suplementado con SFB 0.5%.

IL-8: células MCF-7 + IL-8 (50 ng/ml) + medio suplementado con SFB 0.5%.

5.3. Ensayo de formación de mamoesferas.

Las células adheridas control y las tratadas con IL-8 fueron tripsinizadas y contadas en cámara de Neubauer. Se sembró una densidad de 5×10^4 células/ml en placas de 6 pozos con baja adherencia (Nalgene - Nunc International) en medio DMEM/F12 (1:1) sin suero, suplementado con Factor de crecimiento básico de fibroblastos bFGF (del inglés, basic

Fibroblast Growth Factor) 20 ng/ml (PHG0266), Factor de crecimiento epidérmico EGF (del inglés, Epidermal Growth Factor) 20 ng/ml (PHG0315), Insulina-Transferrina-Selenio 10 µg/ml (Sigma), Suplemento B27 2%, Hidrocortisona 0,5 µg/ml (Sigma) y Metilcelulosa 1.5% (Sigma). Las células en estas condiciones se cultivaron durante 5 días. Cada dos días 500 µL de medio fresco fue adicionado a cada pozo. Se contaron las mamoesferas con un tamaño superior a 100 µm. Las mamoesferas provenientes de células adherentes sin tratamiento con IL-8 se usaron como control.

5.4. Doblaje poblacional.

Las células MCF-7 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% en placas de 24 pozos por duplicado a una densidad de 1×10^4 células/ml, durante 5 días. Diariamente las células se tripsinizaron y contaron en cámara de Neubauer. Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula $DT = T \ln 2 / \ln (X_e / X_b)$, en donde T corresponde al tiempo, X_e al número de células al inicio del experimento, y X_b al número de células al final del tiempo de incubación.

5.5. Ensayo de proliferación celular y expresión de Ki67 en células adheridas.

Las células MCF-7 se cultivaron en placas de 24 pozos por duplicado a una densidad de 1×10^4 células/ml, después de adheridas, se lavaron con PBS 1X, y luego se dejaron en medio RPMI 1640 sin suero durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se adicionaron 50 ng/ml de IL-8 recombinante (PHC0084, Invitrogen) en medio RPMI 1640 con SFB al 0.5%. En estas condiciones fueron cultivadas las células durante 5 días. Se adicionaron 50 ng/ml de IL-8 y SFB al 0.5% cada dos días. Las células MCF-7 cultivadas en RPMI 1640 con SFB al 0.5% fueron usadas como control. El día 1, 2, 3 y 5 las células fueron tripsinizadas y contadas en cámara de Neubauer. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el método de exclusión de azul de tripan. En el día 5 las células en las dos condiciones experimentales se marcaron con anticuerpo anti-Ki67 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Biolegend). La adquisición de los datos se llevó a cabo en el citómetro FACS Aria-II (BD Bioscience). El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo. En cada experimento se midieron 50.000 eventos.

5.6. Extracción de RNA y qRT-PCR

Las células adherentes (control e IL-8) se recolectaron después de ser tripsinizadas. Las mamoesferas (control e IL-8) se recolectaron por pipeteo y fueron pasadas a través de un colador (tamaño del poro 100 μm , Corning). Las mamoesferas con un tamaño \geq a 100 μm se recuperaron del colador y se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml, una vez recolectadas se lavaron con PBS 1X. Se usó el pellet celular para realizar la extracción del RNA. El RNA fue extraído usando el método de trizol/cloroformo (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración del RNA se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000). Un microgramo del RNA total se trató con DNase I (Invitrogen) y se usó para la reacción de retrotranscripción (High-Capacity cDNA - Applied Biosystems). El cDNA obtenido se usó para la evaluación de la expresión génica de los genes listados en la (Tabla. 1), 100 ng de cDNA fueron amplificados mediante la técnica de PCR en tiempo real usando la master mix Power SYBR® Green (Applied Biosystems). El análisis se realizó en el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por triplicado y el análisis completo se realizó dos veces de manera independiente. Se calculó la expresión génica relativa. Los valores de Ct fueron normalizados con GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa), tanto en las células control como en las células tratadas con IL-8 en las dos condiciones de cultivo (adheridas y mamoesferas). Para calcular el cambio en la expresión del gen de interés se usó el método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Schmittgen and Livak, 2008). En la (Tabla. 1) se muestra la secuencia de los cebadores usados:

Tabla 1. Secuencia de cebadores.

Gen	Secuencia (5'-3')	
	Forward	Reverse
SNAI1	ACCACTATGCCGCGCTCTT	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
SNAI2	TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA	GACCCTGGTTGCTTCAAGGA
ZEB1	AAGAATTCACAGTGGAGAG	GGTTTCTTGCAGTTTGGGCATT
ZEB2	TGTAGATGGTCCAGAAGAAATG	CCATTGTTAATTGCGGTCT
TWIST1	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG
TWIST2	CTTATGTTTGGGGGAGGTT	TAGCCAAGCAATCACGGAGA
VIMENTIN	CGAGGACGAGGAGAGCAGGATTTCTC	GGTATCAACCAGAGGGAGTGA
E-CADHERIN	TGGACAGGGAGGATTTTGAG	ACCCACCTCTAAGGCCATCT
TJP1	ACAAAGGAGAGGTGTTCCGTGTT	CGTTCTACCTCCTTATGATTTTTACCA
BMI1	CCAGGGCTTTTCAAAAATGA	CCGATCCAATCTGTTCTGGT
GATA3	GCCCCTCATTAAGCCCAAG	TTGTGGTGGTCTGACAGTTCG
RUNX1	CTGCCATCGCTTTCAAGGT	GCCGAGTAGTTTTCATCATTGCC
HOXB4	CGTGAGCACGGTAAACCCC	CGAGCGGATCTTGGTGTTG
NANOG	CCTGTGATTTGTGGGCCT	GACAGTCT CCGTGTGAGGCAT
OCT4	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
SOX2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC
KLF4	TATGACCCACACTGCCAGAA	TGGGAACCTTGACCATGATTG
PPAR γ	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC	AACTCAAACCTTGGGCTCCATAAAG
AGGRECAN	CGAAACATCACTGAGGGTGAAG	GTGGCCTCTCCAGTCTCATTCT
ALP	ATGGGATGGGTGTCTCCACA	CCACGAAGGGGAACCTTGTC
Housekeeping GAPDH	GACCCCTCATTGACCTCAAC	CTTCTCCATGGTGGTGAAGA

5.7. Ensayo de Western blot para marcadores de EMT

Se prepararon lisados de proteína total a partir de células adherentes y mamoesferas en las diferentes condiciones. Para la extracción se utilizó buffer de lisis (2X Assay/Lysis Buffer - Cell Biolabs, INC, 240102) y cóctel con inhibidores de proteasas (Sigma, P8340). La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el kit "Pierce BCA Protein Assay" (Thermo scientific). Se sembraron 20 µg de proteína total en un gel al 10% de poliacrilamida, la separación se realizó durante 3 horas a 70 voltios. Luego de las 3 horas de corrido se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad) en un sistema de semiseco (Bio-Rad). Después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, los anticuerpos primarios se agregaron a una dilución 1:500 y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-β-actin (Biolegend, 622102), anti-SLUG (Invitrogen, PA1-86737), anti-ZEB1 (Sigma, HPA027524) y anti-E-cadherin (Sigma, SAB4300693). Transcurrida la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a lavar las membranas de PVDF 5 veces con TBST 1X y luego se incubaron con anticuerpo secundario (anti-conejo) a una dilución de 1:1000 durante 1 h a temperatura ambiente, luego de esta incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBST 1X. La detección se realizó utilizando el kit BCIP/NBT (Promega). Para la cuantificación, la intensidad de las bandas específicas (E-cadherina, ZEB1 y SNAI2) se normalizó con respecto a la intensidad de la banda de β-actina. La expresión relativa de proteínas se comparó con el control.

5.8. Ensayo consecutivo de formación de mamoesferas

Las células adheridas control y las tratadas previamente con IL-8, se tiñeron con CellTrace™ CFSE de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Se indujo la formación de mamoesferas como se describió anteriormente (ensayo de formación de mamoesferas), después de 5 días de cultivo, las mamoesferas fueron recolectadas y tripsinizadas durante 10 minutos a 37 ° C, ocasionalmente durante los 10 minutos de incubación se realizó pipeteo con el fin de disociar las células de manera mecánica. Las

uniones entre las células que componen las mamoesferas son fuertes lo que hace que después de la tripsinización se preserven algunos grupos de células lo que disminuye con la disociación mecánica. Una vez disociadas las células se procedió a contarlas. Para la segunda generación se sembró la misma densidad usada en la primera generación. Para la tercera generación se realizó el mismo procedimiento que para la segunda generación. Las mamoesferas se observaron por microscopía de fluorescencia, se contaron las que presentaron un tamaño mayor a 100 μm y se fotografiaron.

5.9. Ensayo curación de heridas.

Después de 5 días de cultivo en condiciones adherentes o como mamoesferas (control e IL-8), las células fueron tripsinizadas, contadas y sembradas a una densidad de 50.000 células/ml, en medio completo en placas de 24 pozos, hasta alcanzar una confluencia del 100%. Una vez alcanzada esta confluencia se dejaron sin suero durante la noche. Con ayuda de una punta de micropipeta de 10 μL se hizo una raya, simulando una herida, las células se dejaron migrar por un lapso de 12 h. Se capturaron imágenes a las 0, 6 y 12 h. Para el análisis se usaron al menos 7 imágenes en cada punto de tiempo. El porcentaje de cierre de la herida se estimó mediante el uso del programa ImageJ (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

5.10. Ensayo de migración e invasión dirigida.

Para el ensayo de migración e invasión dirigida se usó el sistema de transwell (TW), se usaron cámaras de Boyden con filtros con tamaño de poro de 8.0 μm (BD Biosciences), en una configuración de 24 pozos. Antes de iniciar el ensayo las cámaras fueron sumergidas en medio RPMI 1640 libre de suero durante 1 h, esto con el fin de humedecer el filtro. Las células adheridas o aisladas de las mamoesferas cultivadas durante 5 días (control o IL-8) se colocaron en la cámara superior a una densidad celular de 1×10^5 células en 100 μl de medio RPMI 1640 sin SFB; a la cámara inferior se le adicionó medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 20%, o 50 ng/ml de IL-8 o 50 ng/ml de SDF-1 (Quimioatrayente). Se permitió que las células migraran durante un período de 48 h. Transcurrido este tiempo, las células en la parte superior de la cámara de Boyden fueron retiradas mediante un lavado

suave con PBS 1X, después de este lavado la cámara se sumergió en metanol durante 15 minutos, luego se sumergió en cristal violeta al 0,5% durante 15 minutos, finalmente se lavó con agua hasta retirar completamente el cristal violeta. Se tomaron al menos 7 imágenes para su análisis con el programa Image J (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012). Para los ensayos de invasión, se siguió la misma metodología que para los ensayos de migración, con una adición, la cámara superior de la cámara de Boyden fue recubierta 100 μ l de Matrigel e incubada durante 1 h antes del inicio del experimento.

5.11. Selección de células a través del sistema TW.

Se sometieron a varios procesos de migración las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas previamente tratadas con IL-8, para este fin se utilizó el sistema TW y se usó como quimioatrayente SFB al 20%, se dejaron migrar por 48 h. Las células que migraron al pozo inferior fueron cultivadas, tripsinizadas y puestas a migrar nuevamente en el mismo sistema, realizándose 3 procesos de selección usando las mismas densidades celulares (1×10^5 células en 100 μ l de medio RPMI 1640 sin SFB).

5.12. Ensayos de diferenciación a linajes adipo-, condro- y osteogénicos.

Después de 5 días de cultivo en condiciones adherentes o como mamoesferas, las células fueron tripsinizadas, contadas y sembradas a una densidad de 1×10^5 células/ml en placas de 24 pozos. Transcurridas 24 h, se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS 1X. Se inició la inducción con la adición de medios de diferenciación para adipocitos, condrocitos y ostoblastos (StemPro®). Las células se cultivaron durante 9 días, se añadió 500 μ L de medio nuevo cada 3-4 días. Después de 9 días de cultivo, las células se lavaron con PBS 1X y fijaron con formalina durante 30 min (Sigma-Aldrich). Para la diferenciación adipogénica, las células se tiñeron con solución Oil Red-O durante 1 h (Sigma); para la diferenciación condrogénica, las células se tiñeron con safranina O al 0,1% durante 3 min (Sigma); para la diferenciación osteogénica, se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en las células utilizando el kit de tinción BCIP/NBT (Sigma). Las células se observaron con un microscopio invertido y se fotografiaron.

5.13. Análisis de expresión génica - diferenciación multipotente

Después de nueve días de inducción las células fueron tripsinizadas y el RNA extraído como se describió anteriormente. Se evaluó la expresión de PPAR- γ , Aggreca y APL para la diferenciación adipo-, condro y osteogénica, respectivamente. Los controles y el análisis de datos se realizaron como se describió anteriormente.

5.14. Ensayo de quimiorresistencia.

Las células MCF-7 se sembraron en placa de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 células/ml, una vez adheridas se dejaron toda la noche sin SFB. Se inicio la inducción con IL-8 y se cultivaron durante 5 días, una vez transcurridos los 5 días se inició el tratamiento con Paclitaxel (PLX, 0.5 y 1 μ M) y Doxorubicina (DOX, 0.5, 1 y 2 μ M). Las células fueron tratadas con los agentes quimioterapéuticos durante 4 días, transcurridos los 4 días, se adicionaron 50 μ l de MTT y se incubaron por 4 horas. Finalizada la incubación se retiró el medio y se adicionaron 100 μ L de DMSO, una vez disuelto el formazan se leyó la absorbancia en un lector de microplacas 550 nm. Como control se utilizó DMSO al 1%.

Para el tratamiento de las mamoesferas se inició el cultivo en condiciones no adherentes y transcurrido un día, se inició el tratamiento con PLX y DOX, con las mismas concentraciones usadas en las células adheridas. En el día cuatro de cultivo se añadió 100 μ l de MTT a cada pozo y se incubó durante 4 h a 37 °C. Se tomó el contenido de cada pozo y se transfirió a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 11.000 g, se descartó el sobrenadante, al pellet se añadieron 100 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazan. Finalmente, el contenido del tubo Eppendorf se transfirió a una placa de 96 pozos, y la absorbancia se midió en un lector de microplacas a 550 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó como sigue:

(Absorbancia de las células con el compuesto PLX o Dox / Absorbancia de las células con el DMSO) * 100.

5.15. Análisis por citometría-Inmunofenotipo.

Después de 5 días de cultivo en condiciones adherentes y no adherentes (mamoesferas), las células fueron tripsinizadas y contadas. Un total de 1×10^6 células fueron resuspendidas en 500 μ l de PBS 1X con albúmina de suero bovino al 0.2%. y marcadas con anticuerpos específicos para los antígenos enunciados a continuación: FITC-conjugado con mouse anti-human CD44 (BD), R-Phycoerythrin conjugado con mouse anti-human CD24 (BD), allophycocyanin-conjugado con mouse anti-human CD49f (Miltenyi), y VioBlue- conjugado con mouse anti-human EpCAM (Miltenyi).

Células incubadas con control de isotipo fueron usadas como control negativo, los controles de isotipo usados fueron los siguientes: FITC Mouse IgG2b, k Isotype Control Antibody (Biolegend), R-Phycoerythrin Mouse IgG2a, k Isotype Control Antibody (BD), APC Mouse IgG2a, Isotype control (Miltenyi) y Pacific Blue Mouse IgG1, k Isotype Control Antibody (Biolegend).

Los diferentes anticuerpos fueron incubados de acuerdo con las instrucciones del fabricante, transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con PBS 1X para remover el exceso de anticuerpo. La adquisición de los datos se llevó a cabo en el citómetro FACS Aria-II (BD Bioscience). El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo. En cada experimento se midieron 50.000 eventos.

5.16. Ensayo clonogénico

Después de 5 días de cultivo en condiciones adherentes y de mamoesferas, las células fueron tripsinizadas y contadas, un total de 500 células/ml fueron sembradas en placas de 6 pozos y cultivadas en medio completo durante 12 días (se añadió medio fresco cada 3 días). Una vez transcurridos los 12 días, el medio se retiró, se lavó dos veces con PBS 1X, y se tiñó con cristal violeta. El conteo de las colonias se realizó con el software Image J (39).

5.17. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, Inc). Todos los resultados se expresaron como la media y el error estándar de la media

(SEM). Se utilizó la prueba t de Student para: Ensayo de formación de mamoesferas, análisis de expresión génica, cicatrización de heridas, migración celular dirigida y ensayos de invasión. Se usó ANOVA unidireccional para: ensayo clonogénico y se usó ANOVA bidireccional para: ensayo de formación de mamoesferas y quimiorresistencia (ensayo de viabilidad celular MTT). El valor de P fue considerado significativo con los siguientes valores: * <0.05, ** <0.01 o *** <0.001.

6.Resultados

6.1. Capítulo I: Efecto de la IL-8 sobre las características fenotípicas (CD44, CD24, CD49f, EpCAM, ALDH y E-cadherina), la expresión de marcadores asociados a la EMT y la frecuencia de CSC en las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas.

6.1.1. La IL-8 promueve cambios morfológicos, la adquisición de un programa parcial de EMT, y aumento en la capacidad de formación de mamoesferas sin alterar la proliferación en la línea celular MCF-7.

En el presente estudio se investigó el papel de la IL-8 sobre el fenotipo y las características funcionales de las células MCF-7 presentes en las mamoesferas con relación al mantenimiento de la EMT y de las funciones *stem*. Previamente se había demostrado que la IL-8 tenía un papel importante en la inducción de EMT y en la adquisición de propiedades *stem* por parte de las células MCF-7 en condiciones de adherencia (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017). En este trabajo se determinaron las características fenotípicas y funcionales de las células presentes en las mamoesferas de células MCF-7 que habían sido inducidas previamente con IL-8.

Efectivamente, se encontró que el tratamiento con IL-8 de las células MCF-7 adheridas indujo cambios morfológicos en un grupo de células dentro de toda la población (Figura 1A). Estos cambios se caracterizaron por la pérdida de la morfología típica epitelial (células creciendo en forma de adoquín), con ganancia de una morfología fibroblastoide. La mayoría de las células en cultivo preservaron sus características epiteliales y un número menor de células presentaron morfología fibroblastoide, la cual, se caracterizó además por presentar rasgos epiteliales y mesenquimales (fenotipo híbrido, E/M); observándose algunas veces que se conservaba la adhesión célula-célula (Figura 1A). Estos resultados sugieren que la IL-8 tiene efecto heterogéneo sobre las células MCF-7.

Para determinar si estos cambios en la morfología estaban relacionados con la EMT, se analizó la expresión génica de FTs asociados a este programa biológico: SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2; dos proteínas importantes presentes en las uniones celulares: E-cadherina y la proteína de unión estrecha 1 (TJP1); y la proteína de filamentos intermedios Vimentina. Durante la EMT, las células tumorales pierden sus características epiteliales y adquieren rasgos de células mesenquimales, además de adquirir características de células *stem* (Tam and Weinberg, 2013). Se encontró un aumento en la expresión de Vimentina, TJP1 y E-cadherina, y reducción en la expresión de SNAI1 y TWIST1 en las células adheridas tratadas previamente con IL-8, comparado con las células adheridas control (Figura 1B). En cuanto a la expresión de FTs asociados a la EMT no se encontró un aumento en su expresión que fuera estadísticamente significativo entre las células control y las células tratadas con IL-8, lo cual puede deberse a que la expresión de estos genes puede estar regulada temporalmente o que su expresión aumentada sea característica de células con fenotipo mesenquimal completo. El número de células adheridas tratadas con IL-8 que presentaron morfología mesenquimal o híbrida fue reducido comparado con las células que presentaron la morfología típica epitelial.

Figura 1.

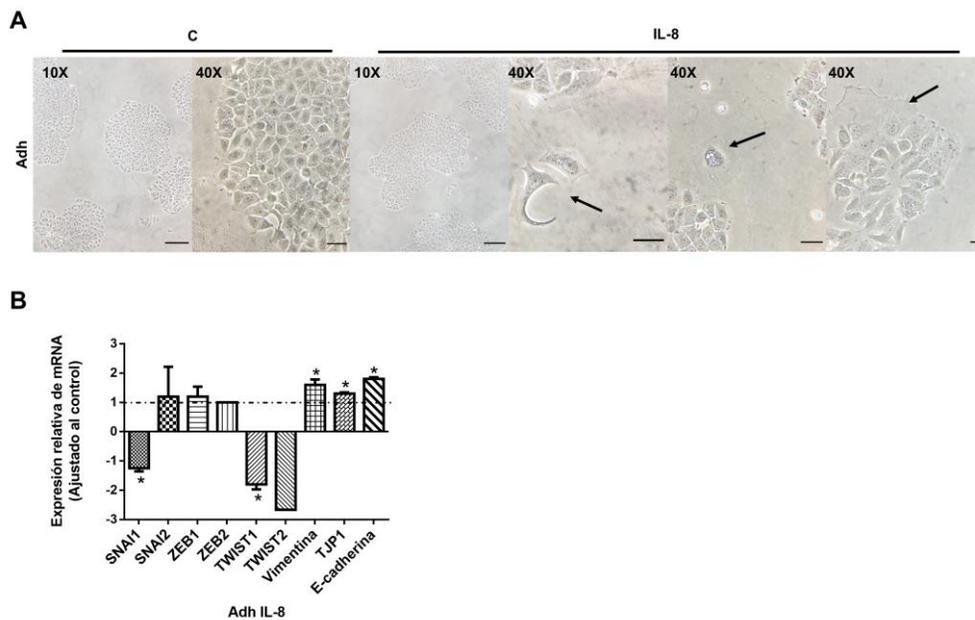


Figura 1. La IL-8 promueve cambios morfológicos en las células adheridas.

A) Morfología de las células adheridas (Adh) control y estimuladas con IL-8 durante 5 días de cultivo. Las flechas indican células con su morfología epitelial alterada (células alargadas similares a fibroblastos). Barra de escala de 100 μ m. Adh= células Adheridas. C= control. **B)** Niveles de expresión génica de factores de transcripción (FTs) asociados a la EMT SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2, Vimentina, TJP1 y E-cadherina en células Adh MCF-7 previamente tratadas con IL-8. Se

determino mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células Adh control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) (n=2).

La EMT generalmente induce la adquisición de propiedades *stem* por parte de las células tumorales (CSC). Un método utilizado para el enriquecimiento de CSC es el cultivo en condiciones no adherentes en medio libre de suero, suplementado con factores de crecimiento (ensayo de formación de mamoesferas). Este ensayo además es útil para evaluar la capacidad de autorrenovación, una propiedad esencial de las CSC y la resistencia a la anoikis. Solo las células resistentes a la anoikis serán capaces de sobrevivir en condiciones de no adherencia. El análisis de la capacidad de formación de mamoesferas mostró que las células tratadas con IL-8 tienen mayor capacidad de formación de mamoesferas (Figura 2A) y que las mamoesferas formadas se caracterizan por tener tamaños superiores a 100 µm (Figura 2B).

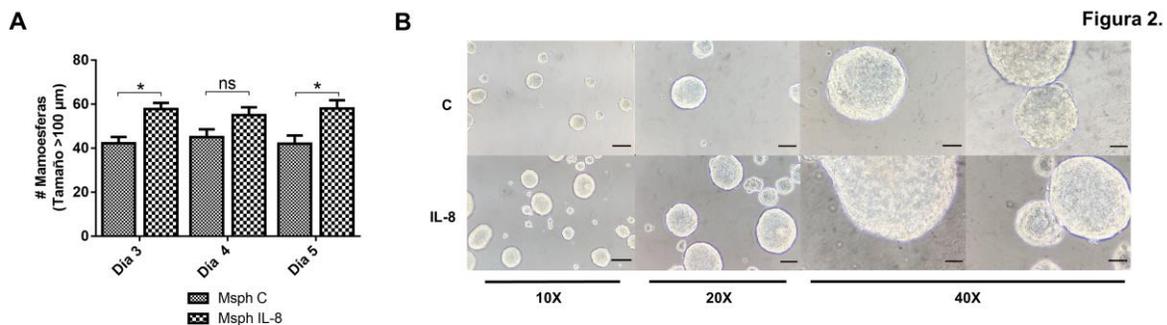


Figura 2. Capacidad de formación de mamoesferas.

A) Cuantificación del número de mamoesferas (Msph) con tamaño mayor >100 µm en los días 3-5 en presencia (Msph IL-8) o ausencia (Msph C) de IL-8. Las barras representan el error estándar de la media SEM (* p<0.05; ** p<0.01; *** p <0.001; ns no significativo). **B)** Morfología y tamaño de las Msph después de 5 días de cultivo a diferentes magnificaciones en presencia o ausencia (control, C) de IL-8. Se muestra una imagen representativa de un experimento. La barra de escala representa 100 µm.

Primero se estableció si las diferencias de tamaño en las mamoesferas se debían a una mayor tasa de proliferación en las células tratadas con IL-8. Se estableció el tiempo de doblaje poblacional de las células MCF-7 con la siguiente fórmula $DT = T \ln 2 / \ln(Xe/Xb)$ (T: tiempo, Xe: # células al inicio del experimento, Xb: # células al final del tiempo de incubación), este tiempo fue de 28,3 h (Figura 3A). Se evaluó la tasa de proliferación de las

células adheridas control y tratadas con IL-8 y se encontró que las células en ambas condiciones presentaron tasas de proliferación similares (Figura 3B). La evaluación de la expresión de Ki67 mostró que las células control y las células tratadas con IL-8 presentaron una expresión similar de este marcador (Figura 3C). Lo cual sugiere que el tamaño aumentado de las mamoesferas no es consecuencia de un aumento en la tasa de proliferación de las células adheridas tratadas con IL-8. Se realizó el análisis de la contribución de las CSC en la formación de las mamoesferas de primera generación a través de los días. Las células adherentes se tiñeron con CFSE para poder realizar su seguimiento durante el ensayo de formación de mamoesferas. En el día 2 se observó que las mamoesferas control mostraron menos células con señal intensa de CFSE, comparado con las mamoesferas tratadas previamente con IL-8, las cuales mostraron mayor número de células CFSE+. El día 3 se mantuvo el patrón del día 2 y adicionalmente las mamoesferas adquirieron una morfología más definida. El día 4 las mamoesferas ganaron tamaño. El día 5 se observó mamoesferas de gran tamaño en la condición IL-8, además se observó mayor cantidad de células CFSE+, comparado con las células de las mamoesferas control (Figura 3D). La cuantificación de las señales de CFSE+ mostró que las mamoesferas previamente tratadas con IL-8 presentan un mayor número de células con baja tasa de proliferación, las cuales podrían corresponder a células quiescentes con propiedades *stem* (Figura 3E). Estos resultados sugieren que la IL-8 no aumentó la tasa de proliferación de las células adheridas, ni tampoco tuvo un efecto posterior sobre la proliferación durante la formación de las mamoesferas. De esta manera, se descarta que una mayor proliferación sea responsable de la generación de mamoesferas de mayor tamaño y que esto se debe a otras características adquiridas por las células.

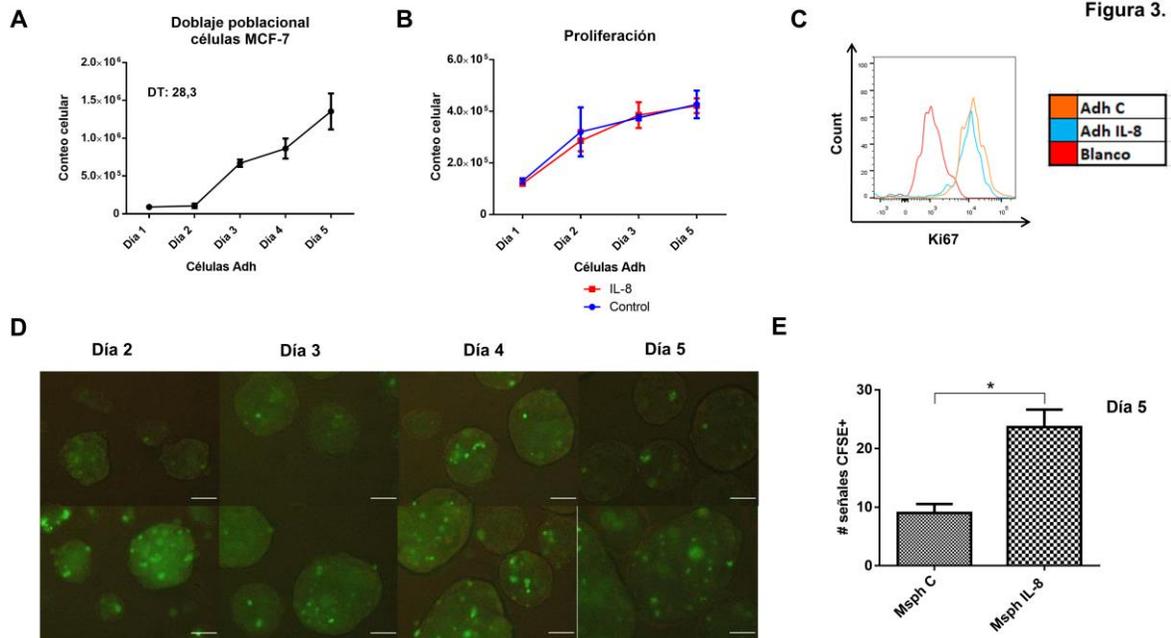


Figura 3. Tiempo de doblaje poblacional y proliferación celular.

A) Tiempo de doblaje poblacional células adheridas MCF-7, conteo celular en los días 1-5. Tiempo de doblaje DT: 28,3 h. **B)** Proliferación celular en células adheridas en los días 1-5 en presencia o ausencia (C) de IL-8. El recuento celular se realizó utilizando el método de exclusión de azul de tripano. **C)** Análisis representativo de una citometría de flujo para la expresión de Ki-67 en presencia o ausencia de IL-8; Adh C: células adherentes control. Adh IL-8: células adherentes tratadas estimuladas con IL-8. *Distribución dinámica de las células CFSE+ durante 5 días de formación de Msph.* **D)** Msph derivadas de células Adh teñidas con CFSE, tratadas previamente con IL-8 durante 5 días. Se muestra una imagen representativa del experimento. La barra de escala representa 100 μm . **E)** Cuantificación de señales positivas para CFSE en las Msph. Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La evaluación de los factores de transcripción asociados a la EMT en las células aisladas de mamoesferas mostró una reducción en la expresión de SNAI1, TJP1 y E-cadherina, y un aumento en la expresión de SNAI2 y ZEB1 y esto fue dependiente de la IL-8 (Figura 4A). En conjunto estos resultados sugieren que el microambiente de las mamoesferas y el tratamiento con IL-8 induce un programa similar a la EMT en las células MCF-7 mediado por el aumento de SNAI2 y ZEB1 y la disminución de TJP1 y E-cadherina (Figura 4B).

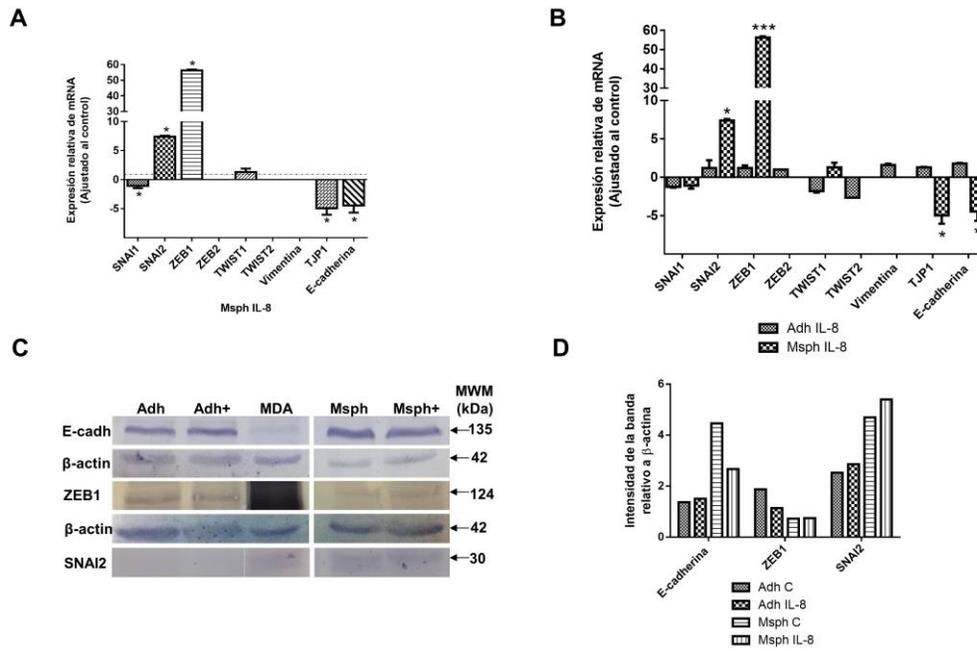


Figura 4.

Figura 4. Expresión de marcadores asociados a la EMT.

A) Niveles de expresión génica de FTs asociados a EMT: SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2, Vimentina, TJP1 y E-cadherina en MspH previamente tratadas con IL-8, determinado por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH y los cambios se calcularon con respecto a las células aisladas de MspH control. Las barras representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns no significativo). **B)** Niveles de expresión génica de FTs asociados a EMT: SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2, Vimentina, TJP1 y E-cadherina en células Adh y MspH previamente tratadas con IL-8, determinado por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH y los cambios se calcularon con respecto a las células Adh tratadas previamente con IL-8. Las barras representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns no significativo). **C)** Análisis de western blot (WB) para E-cadherina, ZEB1 y SNAI2. Adh: células adheridas control; Adh +: células Adh previamente tratadas con IL-8; MDA: línea celular MDA-MB-231; MspH: mamoesferas control; MspH+: mamoesferas previamente tratadas con IL-8; MWM: marcador de peso molecular. **D)** Cuantificación relativa de las proteínas ZEB1, E-cadherina y SNAI2 en el WB. Las intensidades de las bandas se normalizaron con respecto a β -actina.

Para confirmar los cambios observados en los niveles de expresión de los genes SNAI2, ZEB1, y E-cadherina se procedió a evaluar su expresión mediante Western Blot (Figura 4C). El análisis de densitometría mostró que la expresión de E-cadherina aumentó en un 50% en las mamoesferas control, en comparación con las células adheridas. Adicionalmente el tratamiento previo con IL-8 de las mamoesferas redujo la expresión de E-cadherina en aproximadamente un 30% comparado con las mamoesferas control (Figura 4D). La expresión de SNAI2 se encontró aumentada en las mamoesferas en comparación con células adherentes, sin embargo, estas diferencias fueron independientes del

tratamiento previo con IL-8 (Figura 4D). La expresión de ZEB1 fue muy similar en todas las condiciones; no se encontraron diferencias entre las células adheridas y las mamoesferas previamente tratadas con IL-8. Estos hallazgos sugieren que las mamoesferas están conformadas por células heterogéneas algunas con fenotipos híbridos, donde la E-cadherina podría ser una proteína fundamental para la adhesión célula-célula y la capacidad de formación de mamoesferas.

6.1.2. Identificación de dos poblaciones celulares que difieren en su proporción y en la expresión de marcadores de superficie (CD44, CD24, CD49f y EpCAM)

Las CSC se han identificado también por la expresión de marcadores específicos en la superficie celular. En el cáncer de seno, una expresión elevada de CD44 y baja de CD24 (CD44⁺/CD24^{-/Low}), se ha asociado con características de células *stem* (Li *et al.*, 2017). Adicional a estos marcadores, la molécula de adhesión EpCAM y la integrina $\alpha 6$ (CD49f) se han utilizado para la clasificación de las células de la glándula mamaria en células progenitoras y células lumbales diferenciadas (Cariati *et al.*, 2008) (Hiraga, Ito and Nakamura, 2016). Se evaluó mediante citometría de flujo las células adheridas (Figura 5A) y las células aisladas de mamoesferas (Figura 5B). Se observó que había algunas diferencias en la expresión de los marcadores CD44 (Figura 5C), CD24 (Figura 5E), CD49f (Figura 5G), y EpCAM (Figura 5I), sin embargo, éstas fueron independientes del tratamiento previo con IL-8. La cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) se muestra para CD44 (Figura 5D), CD24 (Figura 5F), CD49f (Figura 5H), y EpCAM (Figura 5J).

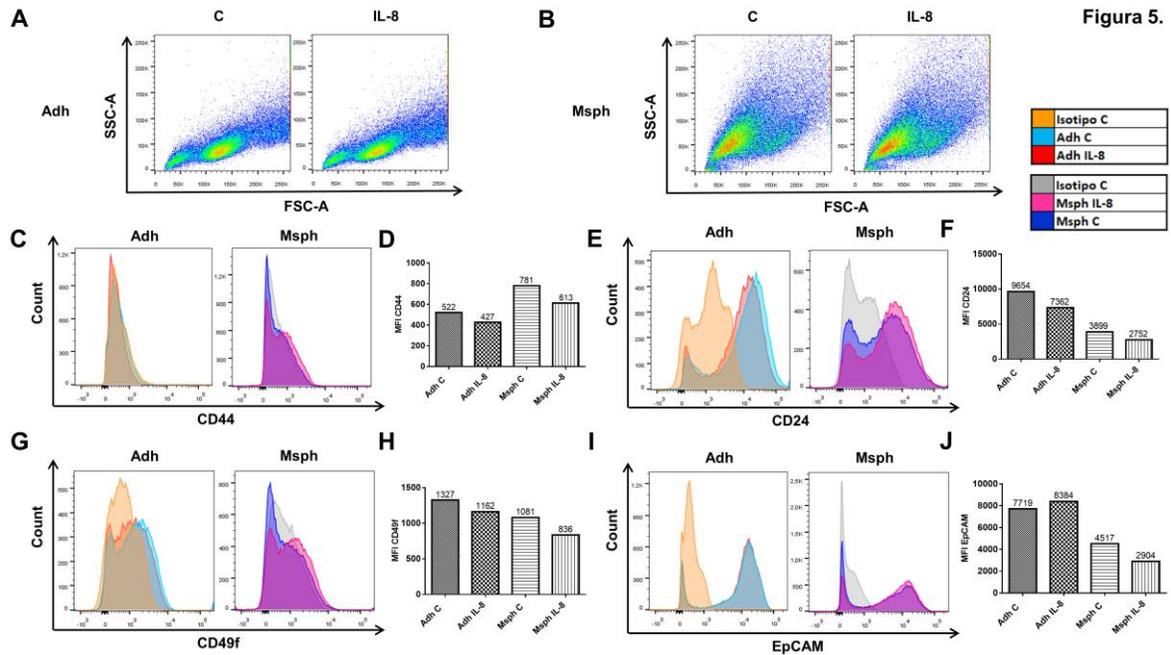


Figura 5. Caracterización fenotípica de las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.

A) Citometría de flujo representativa de la dispersión frontal (FSC-A Forward Scatter) y dispersión lateral (SSC-A Side Scatter) de células adheridas aisladas control o no tratadas (C) y tratadas con IL-8 (IL-8). **B)** Citometría de flujo representativa de la dispersión frontal (FSC-A Forward Scatter) y dispersión lateral (SSC-A Side Scatter) de células aisladas a partir de Msph control o no tratadas (C) y tratadas con IL-8 (IL-8). *Histogramas representativos de la expresión de:* **C)** CD44. **E)** CD24. **G)** CD49f. **I)** EpCAM. *Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de:* **D)** CD44. **F)** CD24. **H)** CD49f. **J)** EpCAM.

Interesantemente la evaluación de estos marcadores en las células adheridas y en las células aisladas de las mamoesferas mostró dos poblaciones celulares que se diferenciaban por su tamaño y complejidad. Estas poblaciones se clasificaron de acuerdo con su dispersión hacia adelante (Forward scatter FSC-A) y dispersión lateral (Side Scatter SSC-A), en una población grande y compleja (FSC-High) y en una población pequeña y menos compleja (FSC-Low) (Figura 6A y 6B). Se encontró que las células adheridas estaban mayoritariamente compuestas por la población FSC-High 50% y en un menor porcentaje por la población FSC-Low 12% (Figura 6A). La evaluación de las mamoesferas mostró también la presencia de estas dos poblaciones, pero la proporción de la población FSC-Low y de la población FSC-High, se invirtió, siendo la población FSC Low, 4 veces más abundante que FSC-High (Figura 6B).

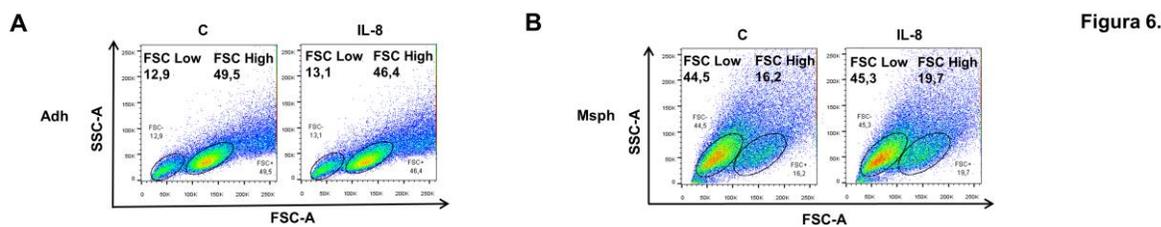


Figura 6. Dos subpoblaciones celulares definidas por FSC-Low y FSC-High en células tratadas o no con IL-8.

A) Células adheridas. **B)** Células aisladas de mamoesferas.

El análisis de IMF mostró que las células de la población FSC-High provenientes de células adheridas o mamoesferas eran más grandes y complejas (Tabla. 2), sin embargo, las diferencias observadas fueron independientes del tratamiento con IL-8.

Tabla 2. Cuantificación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) en las poblaciones FSC Low y FSC High en células adheridas y células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.

		Población	FSC-A IMF	SSC-A IMF
Adh	Control	FSC Low	47137	20911
		FSC High	128324	39197
	IL-8	FSC Low	47549	20828
		FSC High	127108	37892
Msph	Control	FSC Low	71014	53969
		FSC High	146313	55397
	IL-8	FSC Low	71296	51383
		FSC High	144238	55036

Se evaluó la expresión de los marcadores CD44 (Figura 7A y 7B), CD24 (Figura 7D y 7E), CD49f (Figura 7G y 7H) y EpCAM (Figura 7J y 7K) en las poblaciones FSC-Low y FSC-High en las células adheridas y en las células aisladas de las mamoesferas. Se encontró que la expresión de CD44 fue mayor en la población FSC-High de las mamoesferas, comparado con las otras condiciones; esto fue independiente del tratamiento previo con IL-

8 (Figura 7C). Se analizó la expresión de CD24 y se encontró que la población FSC-High de las células adheridas comparado con las demás condiciones presentó mayor expresión de CD24; esto fue independiente de la IL-8 (Figura 7F). Se analizó la expresión de CD49f y se encontró que las células de la población FSC-High y FSC-Low del cultivo adherente y del no adherente expresaban este marcador de manera similar, estos hallazgos fueron independientes de la IL-8 (Figura 7I). Se analizó la expresión de EpCAM y se encontró que su expresión era mayor en la población FSC-High de las células adheridas comparado con todas las condiciones, estas diferencias también fueron independientes de la IL-8 (Figura 7L).

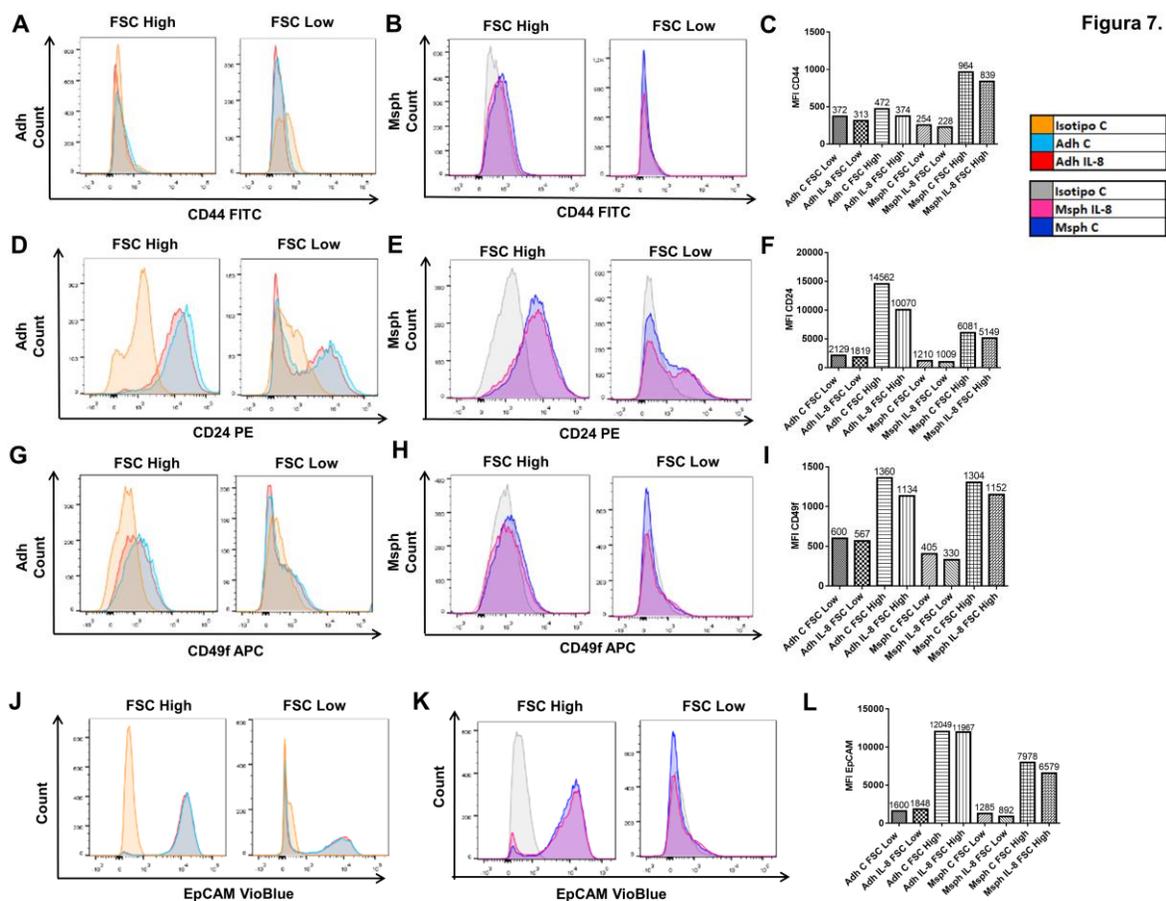


Figura 7. Caracterización fenotípica de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8.

Histogramas representativos de la expresión de: A) CD44 células Adh. B) CD44 células MspH. D) CD24 células Adh. E) CD24 células MspH. G) CD49f células Adh. H) CD49f células MspH. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de: C) CD44. F) CD24. I) CD49f. J) EpCAM.

EpCAM células Adh. **K)** EpCAM células Msph. *Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de: L)* EpCAM.

Estos resultados sugieren que las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas están compuestas por dos poblaciones celulares que se caracterizan por presentar diferencias en su tamaño y complejidad, además de diferencias en la expresión de los marcadores de superficie CD44, CD24, CD49f y EpCAM (Figura 8A).

A

Figura 8.

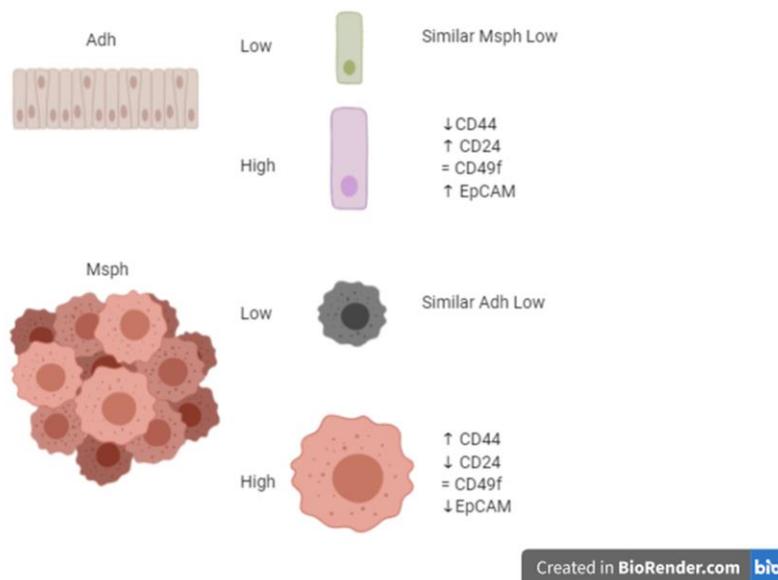


Figura 8. A) Diagrama de las características fenotípicas de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en las células Adh y en las células aisladas de Msph. Comparación entre FSC-High Adh vs Msph y FSC-Low Adh vs Msph.

Para tener un mejor panorama de estos marcadores, se evaluaron simultáneamente en células adheridas y células aisladas de mamoesferas. El análisis de la co-expresión de CD44 y CD24 mostró que la población FSC-High de las mamoesferas tratadas o no con IL-8 presentó mayor porcentaje de células CD44+/CD24+, comparado con la población FSC-High de las células adheridas; lo que es consistente con la adquisición de un fenotipo más mesenquimal por parte de las células FSC High en las mamoesferas (Figura 9A y 9B).

Figura 9.

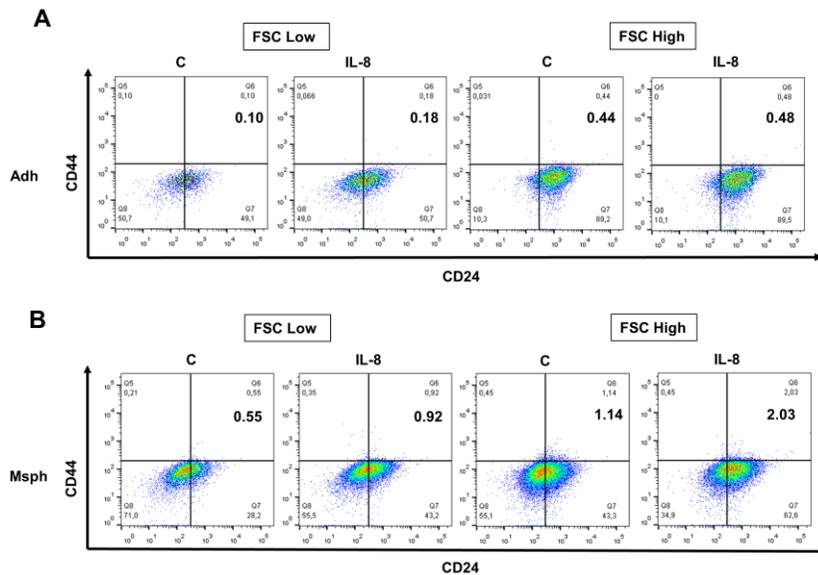


Figura 9. Expresión de CD44 y CD24 de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

A) Grafica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD44 y CD24 en las subpoblaciones FSC-Low y FSC High de las células Adh previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días.
B) Grafica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD44 y CD24 en las subpoblaciones FSC-Low y FSC High de las células aisladas de Msph previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días.

Los marcadores de superficie EpCAM y CD49f permiten diferenciar dos poblaciones: las células que presentan el fenotipo EpCAM⁺/CD49f⁻ corresponden a células luminales diferenciadas y las células que presentan el fenotipo EpCAM⁺/CD49f⁺ corresponde a células progenitoras luminales. El análisis de las poblaciones FSC-Low y FSC-High, mostró un aumento en la población EpCAM⁺/CD49f⁻ (luminal diferenciada) en las mamoesferas, comparado con las células adheridas. El análisis de la frecuencia del fenotipo EpCAM⁺/CD49f⁺ (progenitor luminal) reveló una disminución en la población FSC-High en las mamoesferas comparado con las células adheridas. Interesantemente, la población FSC-High de las células adheridas, mostró un alto porcentaje (88%) de células progenitoras luminales (EpCAM⁺/CD49f⁺), comparado con las células provenientes de mamoesferas (55%), sin embargo, las diferencias encontradas fueron independientes del tratamiento con IL-8 (Figura 10A y 10B). Estos resultados sugieren que las mamoesferas presentan poblaciones heterogéneas de células que expresan de manera diferencial marcadores de superficie que podría determinar distintas funcionalidades y distinto tipo de comunicación

entre las células. Parece entonces, y de acuerdo con los resultados previos, que las mamoesferas están conformadas por varios tipos celulares: células luminales diferenciadas las cuales expresan EpCAM+/CD49f-, y por progenitores luminales las cuales expresan EpCAM+/CD49f+.

Figura 10.

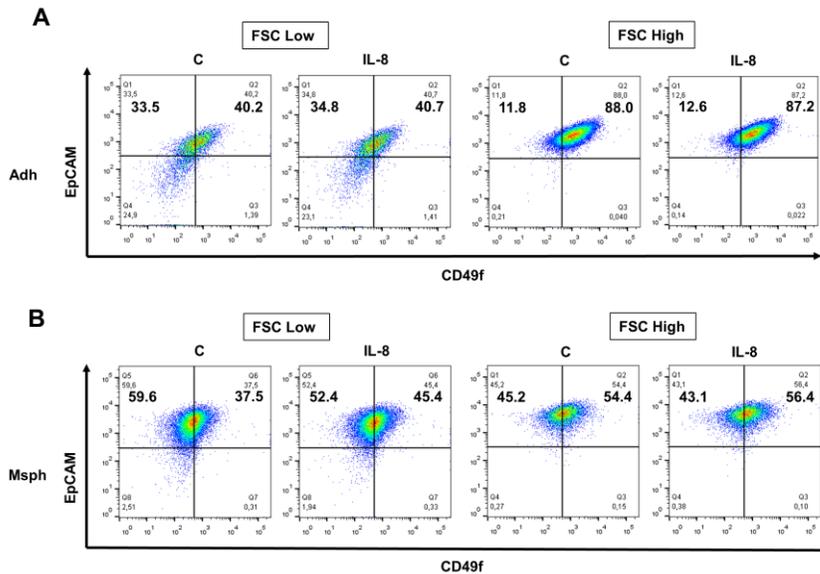


Figura 10. Expresión de CD49f y EpCAM de las subpoblaciones FSC High y FSC Low en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

A) Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD49f y EpCAM en las subpoblaciones FSC-Low y FSC-High de las células Adh previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. B) Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD49f y EpCAM en las subpoblaciones FSC-Low y FSC High de las células aisladas de Msph previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días.

6.1.3. El cultivo no adherente aumenta la actividad de la enzima ALDH de una manera independiente de IL-8.

Otro marcador usado para caracterizar las células con propiedades *stem*, es la enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH), una enzima detoxificante, responsable de la oxidación del retinol a ácido retinoico, indispensable para la diferenciación de las células *stem*. Se ha reportado una mayor actividad de ALDH1 en células *stem* normales y malignas (Li *et al.*, 2017). El análisis de la actividad de ALDH en las células adheridas y en las células aisladas de mamoesferas, mostró que las células provenientes de las mamoesferas presentaron una

actividad mayor de esta enzima. Este resultado sugiere que el cultivo no adherente enriquece esta actividad y esto es independiente de la IL-8 (Figura 11A).

Figura 11.

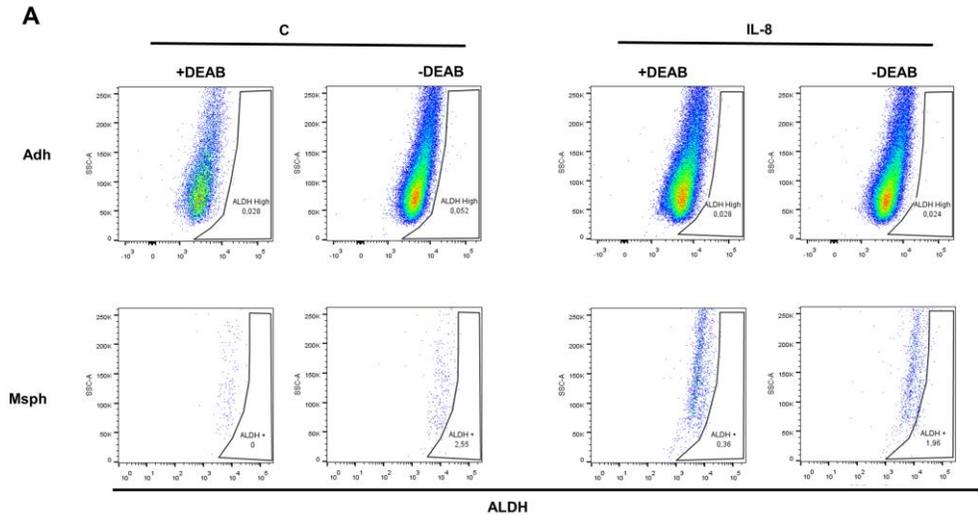


Figura 11. Actividad enzima Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

A) Grafica representativa de la intensidad de fluorescencia de las células ALDH High en las células Adh previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. B) Grafica representativa de la intensidad de fluorescencia de las células ALDH High en las células aisladas de Msph previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. DEAB= inhibidor específico de ALDH.

6.1.4. La IL-8 promueve la reducción en la expresión de E-cadherina y un aumento en su co-expresión con CD24 y EpCAM en las células de las mamoesferas.

Las mamoesferas comparten algunas características con los tejidos y sirven como modelo para estudiar las interacciones célula-célula en ambientes no adherentes. En el contexto fisiológico de los tejidos, las células se comportan de acuerdo con estímulos en tres dimensiones: la interacción célula-célula y célula-ECM son importantes. Se ha sugerido que la E-cadherina podría tener un rol esencial en la formación de las esferas (Smyrek *et al.*, 2019). El análisis de la E-cadherina mostró que el tratamiento con IL-8 induce una reducción en su expresión cuando se compara con mamoesferas control (Figura 12A y 12B).

Investigaciones recientes han demostrado que la E-cadherina es un componente importante en la señalización de rutas de supervivencia celular en condiciones no adherentes. La regulación a la baja de la E-cadherina aumenta las propiedades *stem* en células de cáncer de pulmón, promoviendo la resistencia a la anoikis y la invasividad (Powan *et al.*, 2017).

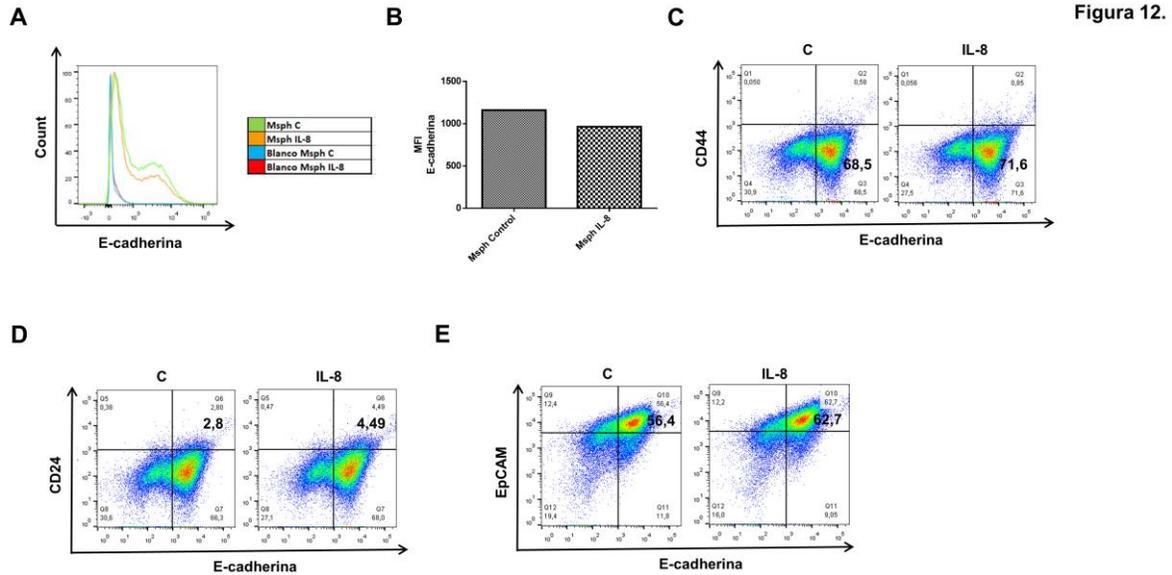


Figura 12. Expresión de CD24 y E-cadherina en células aisladas de MspH tratadas o no con IL-8.

A) Histograma representativo de la expresión de E-cadherina de las células aisladas de MspH previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. **B)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de E-cadherina. **C)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD44 y E-cadherina de las células aisladas de MspH previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. **D)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia para CD24 y E-cadherina de las células aisladas de MspH previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. **E)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia para EpCAM y E-cadherina de las células aisladas de MspH previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días.

El análisis de la co-expresión de CD44 vs E-cadherina (Figura 12C), CD24 vs E-cadherina (Figura 12D), y EpCAM vs E-cadherina (Figura 12E) en las mamoesferas mostró un aumento en la co-expresión con E-cadherina/CD24 y E-cadherina/EpCAM lo cual fue dependiente de la IL-8.

6.2. Capítulo II: Efecto de la IL-8 sobre las características funcionales de las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas: capacidad de autorrenovación, diferenciación multilinaje y potencial clonogénico.

6.2.1. La capacidad de autorrenovación y la expresión de genes asociados a este proceso disminuyen en las células aisladas de las mamoesferas.

Se evaluó el nivel de expresión de genes asociados con la capacidad de autorrenovación: Bmi1, Gata3, RunX1 y HoxB4 en las células adheridas (Figura 13A) y en las células aisladas de mamoesferas (Figura 13B) previamente tratadas con IL-8. El análisis de estos genes en las células adheridas previamente tratadas con IL-8 mostró un aumento en la expresión de Bmi1 y una reducción en la expresión de Gata3, comparado con las células adheridas control (Figura 13A). En las mamoesferas tratadas con IL-8 por el contrario se redujo la expresión de Bmi1, Gata3 y RunX1 cuando se comparó con las mamoesferas control (Figura 13B). La comparación de las células adheridas con las mamoesferas tratadas con IL-8, mostró que, aunque en las células adheridas se aumentó la expresión de genes asociados a autorrenovación; esto se pierde cuando las células se cultivan de manera no adherente y la IL-8 tiene un rol en esta reducción (Figura 13C). El análisis por tres generaciones de la capacidad de formar mamoesferas, mostró que esta capacidad se va reduciendo a medida que transcurren las generaciones (Figura 13D y 13E). En teoría, los ensayos de formación de mamoesferas en serie deberían evidenciar la capacidad de autorrenovación de las células *stem* o células progenitoras. Se observó una disminución en esta capacidad en pocas generaciones (2-3). Esta evaluación mostró más mamoesferas en las células tratadas con IL-8 (166 ± 17) que en los controles (85 ± 5) ($p < 0.001$), en la 1ra generación. En la 2da 3ra generación se encontró una reducción drástica en el número de mamoesferas ($p < 0.001$) en ambas condiciones. Estos resultados sugieren que, aunque las células previamente tratadas con IL-8 fueron muy eficientes produciendo mamoesferas, tienen una capacidad de autorrenovación limitada la cual se pierde después de la primera generación.

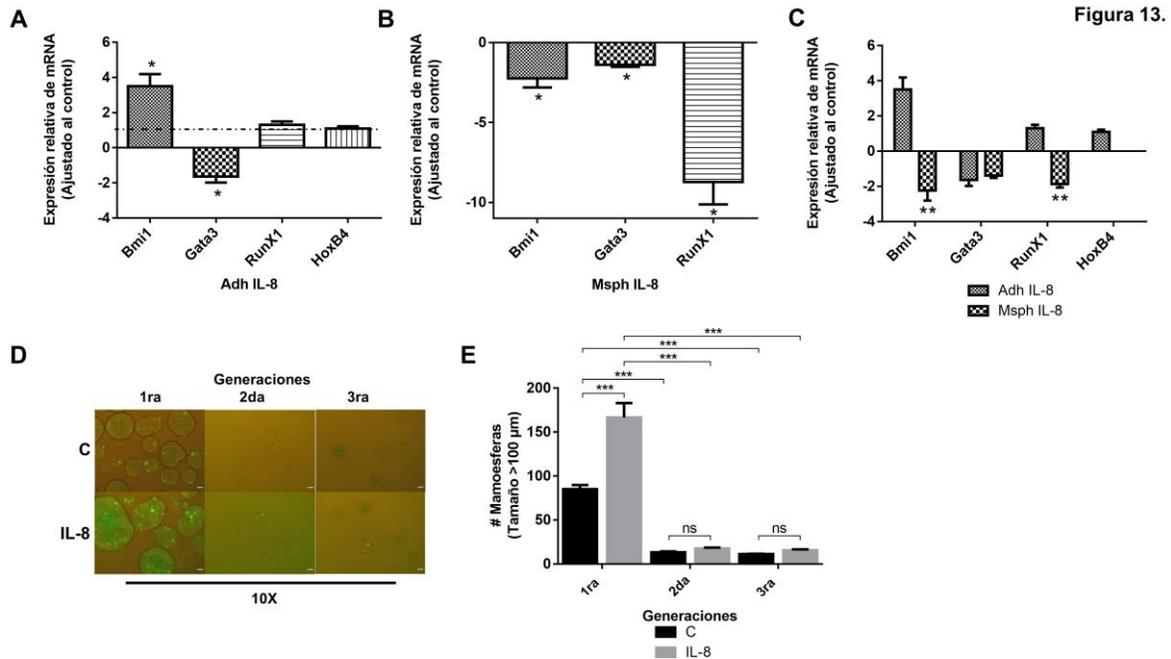


Figura 13. Capacidad de autorrenovación.

A) Niveles de expresión génica de FTs asociados a la autorrenovación: Bmi1, Gata3, RunX1 y HoxB4 en células Adh MCF-7 previamente tratadas con IL-8. Se determinó mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células Adh control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) (n=2). **B)** Niveles de expresión génica de FTs asociados a la autorrenovación: Bmi1, Gata3, RunX1 y HoxB4 en células aisladas de Msph previamente tratadas con IL-8. Se determinó mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células aisladas de Msph control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) (n=2). **C)** Comparación de los niveles de expresión génica de los FTs en células Adh y células aisladas de Msph previamente tratadas con IL-8. **D)** Evaluación de la capacidad de autorrenovación por tres generaciones. Se muestra una imagen representativa de un experimento. La barra de escala representa 100 μm. **E)** Cuantificación del número de Msp (tamaño > 100 μm) en tres ensayos de Msph consecutivos en presencia (IL-8) o ausencia (C) de IL-8. Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Se procedió a evaluar la capacidad de formación de mamoeferas de las células control y células tratadas con IL-8, usando densidades celulares bajas (5.000, 1.000 y 100 células/ml), con el fin de evaluar la frecuencia de células *stem*. Con el ensayo de dilución limitante se cuantificó el número de células *stem* presentes en cada una de las condiciones, encontrando mayor frecuencia de células *stem* en la condición IL-8 (1/92), comparado con el control (1/217) (Tabla. 3), sin embargo, este aumento en la frecuencia no fue estadísticamente significativo.

Tabla 3. Efecto de la IL-8 en la frecuencia de las células stem: Análisis de dilución limitante extrema (ELDA) para la evaluación de la frecuencia de células stem. Las células se cultivaron en condiciones no adherentes y se contaron después de 5 días de cultivo.

# de células sembradas por pozo	Pozos con mamoesferas (# de pozos positivos / # total de pozos cultivados)	
	Control	IL-8
Densidad: cells/ml		
5000	3/3	3/3
1000	3/3	3/3
100	1/3	2/3
Frecuencia células stem	1/217	1/91.5
Intervalo de confianza 95%	(1/49.2 – 1/962)	(1/21.8 – 1/390)
P valor (Chisq)	0.433	

Estos resultados en conjunto con los resultados de la evaluación de la expresión de EpCAM y CD49f sugieren que las células presentes en las mamoesferas son esencialmente células diferenciadas (EpCAM+/CD49f-); lo que explicaría la baja expresión de los genes asociados a autorrenovación. En un inicio del cultivo no adherente las células iniciadoras de la mamoesfera poseen propiedades de autorrenovación (células adheridas inducidas con IL-8 expresaron niveles elevados del gen Bmi1), pero esto se va perdiendo conforme avanzan los días de cultivo. Esto puede ocurrir por la diferenciación de las células stem a células progenitoras y células más diferenciadas o por el número reducido de células stem. Estudios recientes mostraron que el silenciamiento de Bmi1 inhibe la capacidad de formación de esferas y de tumores en cáncer cervical (Xu, Chen and Yang, 2019).

6.2.2. La expresión de genes asociados a reprogramación celular disminuye en las células aisladas de las mamoesferas.

Se evaluó la expresión de genes asociados a reprogramación celular: Nanog, Oct4, Klf4 y Sox2. Las células adheridas tratadas previamente con IL-8, presentaron una baja expresión de Nanog y Oct4, y una alta expresión de Klf4, FT que podría ser importante en la regulación de las propiedades stem en las células adheridas (Figura 14A). En las mamoesferas tratadas previamente con IL-8 se observó baja expresión de Oct4, no se observó expresión de Klf4 y Sox2 (Figura 14B). La comparación de la expresión de estos genes en las células adheridas y en las mamoesferas previamente tratadas con IL-8 mostró que las

mamoeferas presentaron una alta expresión de Nanog, pudiendo ser Nanog importante en la regulación de las propiedades *stem* en las mamoesferas (Figura 14C). Estos resultados sugieren dinámicas diferentes en la regulación de los genes asociados a reprogramación celular los cuales son influenciados por el tipo de cultivo y por la inducción con IL-8.

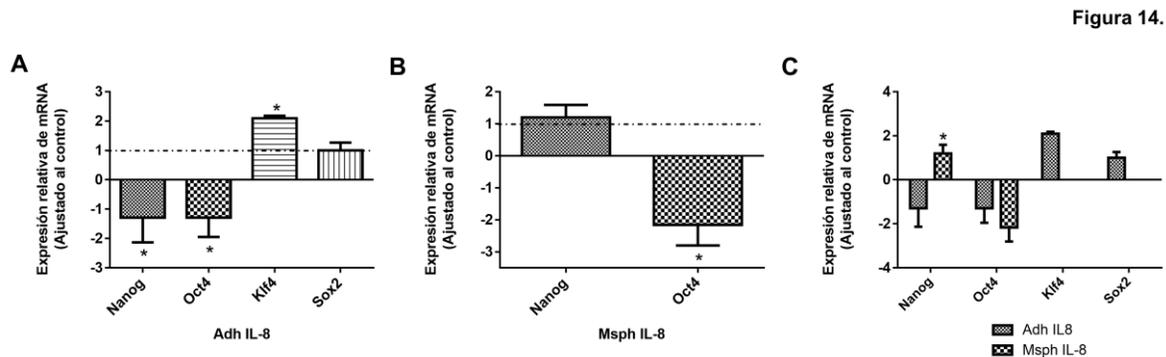


Figura 14. Capacidad de reprogramación celular.

A) Niveles de expresión génica de FTs asociados a la reprogramación celular: Nanog, Oct4, Klf4 y Sox2 en células Adh MCF-7 previamente tratadas con IL-8. Se determino mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células Adh control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (n=2). B) Niveles de expresión génica de FTs asociados a la reprogramación celular: Nanog, Oct4, Klf4 y Sox2 en células aisladas de Msph previamente tratadas con IL-8. Se determino mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células aisladas de Msph control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (n=2). C) Comparación de los niveles de expresión génica de los FTs en células Adh y células aisladas de Msph previamente tratadas con IL-8.

6.2.3. La diferenciación multilínea está afectada en las células aisladas de mamoesferas previamente tratadas con IL-8.

Dado que las células provenientes de las mamoesferas tratadas previamente con IL-8 presentaron fenotipos similares a las células *stem* (marcadores de superficie y expresión génica), se investigó su potencial de diferenciación multipotente (capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos). Se analizó el potencial de diferenciación de las células adheridas y de las células aisladas de las mamoesferas tratadas o no con IL-8 (Figura 15A y 15B). Para realizar la evaluación, se tomaron células en todas las condiciones

y se cultivaron en medio de inducción de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica. Después de 9 días de cultivo con los medios de diferenciación se realizaron tinciones especiales.

Para la diferenciación adipogénica, se utilizó Aceite rojo O el cual permite la tinción de vacuolas lipídicas características de adipocitos maduros. Para la diferenciación condrogénica, se utilizó Safranina O la cual permite detectar grupos carboxilos y grupos sulfato característicos de glicosaminoglicanos constituyente del proteoglicano presente en el tejido cartilaginoso el cual es generado por condrocitos. Para la diferenciación osteogénica se utilizó el sustrato de BCIP/NBT el cual permite detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, activa en los osteoblastos (Battula *et al.*, 2010). Se observó una disminución leve y anómala en la capacidad de diferenciación adipogénica en las células aisladas de mamoesferas previamente tratadas con IL-8, la capacidad de diferenciación condrogénica y osteogénica se preservó (Figura 15A y 15B). Para evaluar en más detalle la capacidad de diferenciación de las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas con IL-8, se analizó la expresión de PPAR- γ (adipocitos), Aggrecan (condrocitos) y APL (osteoblastos). La expresión de PPAR- γ se redujo en las células aisladas de las mamoesferas previamente tratadas con IL-8 (Figura 15D). En las células adheridas no se observó diferencias en la expresión de PPAR- γ , Aggrecan y APL (Figura 15C).

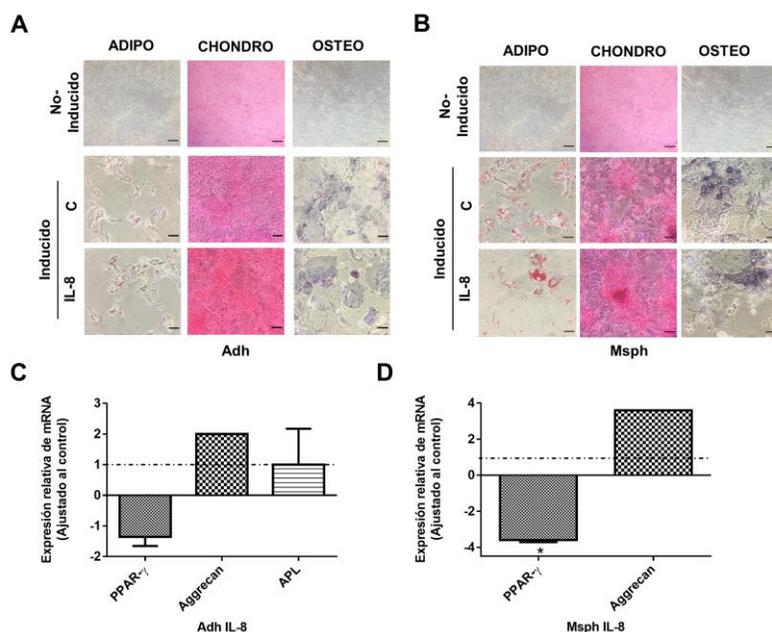


Figura 15. Capacidad de diferenciación multilineaje de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

La capacidad de diferenciación multilineaje se evaluó mediante tinción específica: adipogénica (Aceite Rojo O), condrogénica (Safranina O) y osteogénica (actividad fosfatasa alcalina APL). **A)** Células Adh previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. **B)** Células aisladas de Msph previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8 durante 5 días. **C)** Niveles de expresión génica de: PPAR-γ, Aggrecan y APL en células Adh MCF-7 previamente tratadas con IL-8. Se determino mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células Adh control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) (n=2). **D)** Niveles de expresión génica de: PPAR-γ, Aggrecan y APL en células aisladas de Msph previamente tratadas con IL-8. Se determino mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron con respecto a GAPDH y el cambio relativo en la expresión se calculó con respecto a las células aisladas de Msph control (línea punteada). Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) (n=2).

Se esperaba un aumento en la expresión de PPAR-γ, Aggrecan y APL debido a la diferenciación. Sin embargo, el compromiso de linaje y la diferenciación de las células *stem* mesenquimales es un proceso controlado temporalmente, que involucra la actividad de varios factores de transcripción, citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de la matriz extracelular (Baksh, Song and Tuan, 2004).

6.2.4. El potencial clonogénico está afectado en las células obtenidas de las mamoesferas.

El ensayo clonogénico es un ensayo funcional que permite evaluar la capacidad proliferativa de una sola célula. para producir una colonia de al menos 50 células a través de la expansión clonal, para lo cual requiere al menos 6 divisiones celulares. En este ensayo se elimina la densidad celular natural y se juzga la capacidad proliferativa en estas condiciones (Denekamp, 1994) (Rajendran and Jain, 2018). Se encontró que la capacidad clonogénica de las células aisladas de las mamoesferas se redujo en comparación con las células adheridas, tanto en las células control como en las células previamente tratadas con IL-8 (Figura 16A y 16B). Las células adheridas fueron capaces de formar más colonias comparado con las células de las mamoesferas. La cuantificación del número de colonias mostró que la reducción en la capacidad clonogénica de las mamoesferas fue estadísticamente significativa. Estos hallazgos sugieren que las células obtenidas de las mamoesferas, aunque están activas y son capaces de evitar la anoikis tienen menor capacidad clonogénica en estas condiciones de cultivo. Este resultado va en concordancia con lo observado en la evaluación de la capacidad de formar mamoesferas después de varias generaciones (Figura 13D), donde las células provenientes de mamoesferas perdían esta capacidad.

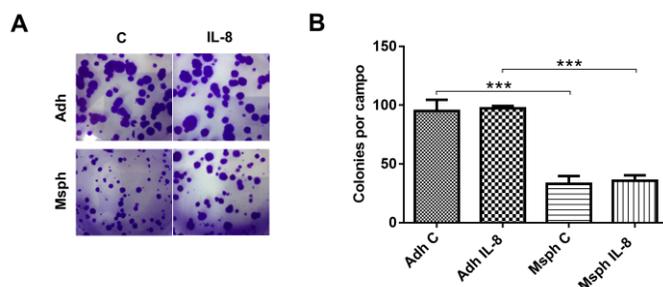


Figura 16.

Figura 16. Capacidad clonogénica de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

A) Ensayo clonogénico de células Adh y células aisladas de Msph tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8. Las colonias se tiñeron con cristal violeta al final del experimento. **B)** Cuantificación de las colonias con un tamaño superior a 2000 μm . Las barras de error representan el error estándar de la media SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- Gestionar el cumplimiento de las actividades técnicas relacionadas con la Resolución 132 de 2006 y el decreto 3770 de 2004.

6.3. Capítulo III: Efecto de la IL-8 sobre la capacidad de migración, invasión y quimiorresistencia en las células adheridas y las células aisladas de las mamoesferas.

6.3.1. La IL-8 potencia la capacidad de migración e invasión de las células provenientes de mamoesferas.

Mostramos que las células aisladas de las mamoesferas previamente tratadas con IL-8 mantuvieron una EMT parcial. Este programa permite que las células tumorales adquieran capacidades de migración que en general están asociadas con más agresividad, progresión de la enfermedad y metástasis (Kalluri and Weinberg, 2009). El ensayo de curación de heridas mostró que la migración era similar en las células adheridas tratadas o no con IL-8 (Figura 17A y 17C). Interesantemente, la migración se incrementó en las células aisladas de mamoesferas tratadas previamente con IL-8 (Figura 17B y 17D).

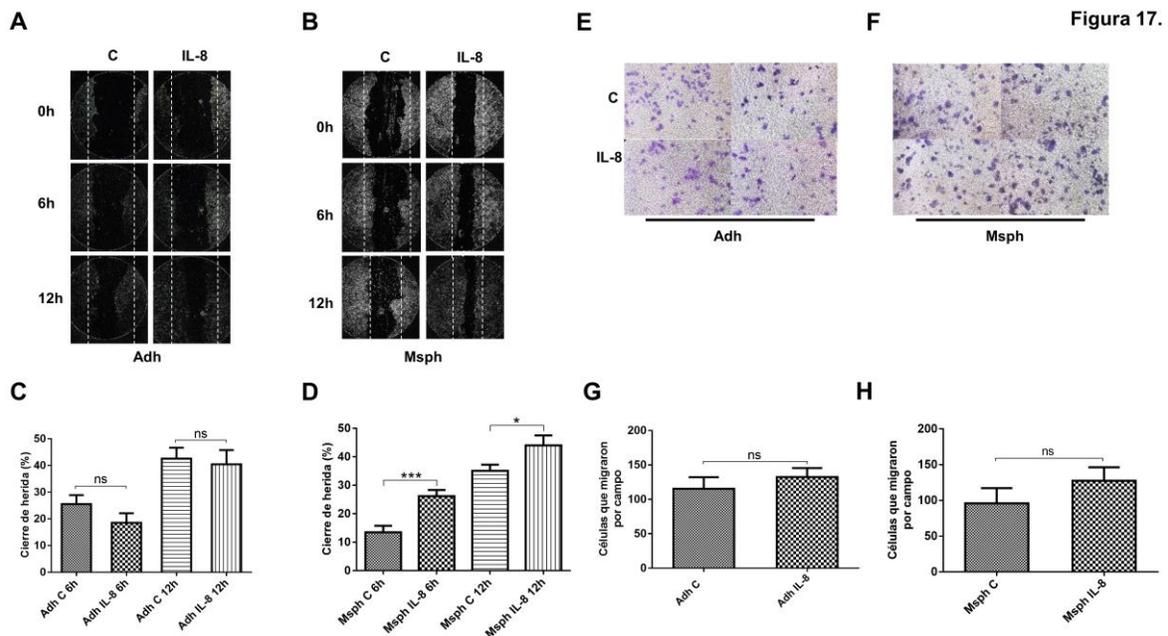


Figura 17. Capacidad de migración de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

Análisis de migración celular mediante el ensayo de curación de heridas. Las imágenes fueron tomadas a las 0, 6 y 12h. El área de la herida se muestra entre dos líneas discontinuas blancas. Se muestra una imagen representativa de los experimentos. C: control; IL-8: células tratadas previamente con IL-8. **A)** Células adheridas. **B)** Células aisladas de Msph. Cuantificación porcentaje de cierre de la herida **C)** Células adheridas. **D)** Células aisladas de Msph. Análisis de migración celular en el sistema Transwell (TW), SFB 20% en el compartimiento inferior se utilizó como

quimioatrayente. **E)** Células adheridas. **F)** Células aisladas de Msph. Cuantificación de las células migratorias por campo. **G)** Células adheridas. **H)** Células aisladas de Msph.

Se evaluó la capacidad de migración a través del sistema transwell usando como quimioatrayente SFB al 20%. Se encontró que las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas tratadas o no con IL-8 presentaron una capacidad de migración similar (Figura 17E y 17G). Las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas responden al SFB, el cual está compuesto por albumina, factores de crecimiento, aminoácidos, azúcares, lípidos y hormonas (Johnson, 2012). Estos resultados sugieren que las células adheridas y las células provenientes de mamoesferas responden a los distintos constituyentes del SFB ocasionando la quimiotaxis de las células debido al gradiente generado por el SFB.

La IL-8 tiene un papel importante en la invasión y la metástasis a través de la interacción con sus receptores CXCR1 y CXCR2 (Bi *et al.*, 2019). La activación de CXCR1 por su ligando, permite la movilización de calcio intracelular, activación de las rutas de señalización Ras/MAPK y PI3K, la quimiotaxis de la célula y la adhesión (Park *et al.*, 2012) (Ha, Debnath and Neamati, 2017). Se evaluó la expresión del receptor CXCR1 diariamente durante 5 días en las células adheridas tratadas o no con IL-8; se encontró que el día 1 las células adheridas tratadas previamente con IL-8 presentaron mayor expresión de CXCR1, comparado con las células control (Figura 18A). En el día 2 se observó una disminución en la expresión del receptor en las células inducidas con IL-8, igualando su expresión con las células control. Este comportamiento se mantuvo en el día 3, día 4 y en el día 5. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia para CXCR1 se presenta en la (Figura 18B). Estos resultados sugieren que el tratamiento con la IL-8 promueve el aumento en la expresión de este receptor (día 1) y que una vez activado por su ligando, puede ser internalizado (no detección de su expresión en la superficie celular). Adicionalmente, la internalización puede sugerir la activación de rutas de señalización cascada abajo, que promueven la adquisición de una mayor capacidad de migración e invasión (Ha, Debnath and Neamati, 2017). Se evaluó la capacidad de migración de las células adheridas previamente tratadas con IL-8, y su respuesta a la IL-8 cuando es usada como quimioatrayente; se encontró que las células adheridas previamente tratadas con IL-8 presentan mayor capacidad de migración en este sistema (Figura 19A).

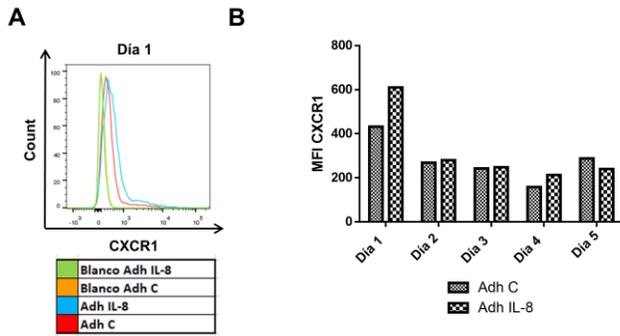


Figura 18.

Figura 18. Expresión de CXCR1 en células adheridas tratadas o no con IL-8.

Histograma representativo de la expresión de CXCR1 en células Adh previamente tratadas (IL-8) o no (C) con IL-8. A) Día 1. B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CXCR1.

La metástasis es un proceso complejo que involucra la diseminación de las células tumorales de su tejido de origen a órganos distantes. La metástasis involucra varios pasos, entre ellos la invasión local, durante esta etapa las células tumorales degradan la lámina basal compuesta por matriz extracelular, lo que les permite pasar a través de los vasos y entrar en el torrente sanguíneo (Arvelo, Sojo and Cotte, 2016). El análisis de la capacidad de invasión a través del ensayo de transwell, usando matrigel, es un buen sustituto para evaluar la capacidad de degradación de matriz extracelular y la invasión por parte de las células tumorales. La evaluación de la capacidad de degradación del matrigel y posterior invasión, mostró que las células provenientes de mamoesferas previamente tratadas con IL-8 tienen mayor capacidad de invasión que las células control cuando se usa como quimioatrayente IL-8 (Figura 19B). Estos resultados mostraron que las células adheridas y las células provenientes de mamoesferas inducidas con IL-8 responden a la IL-8 como quimioatrayente y además que estas últimas tienen la capacidad de degradar matriz extracelular e invadir. La IL-8 además de promover cambios fenotípicos en las células tumorales, tiene un papel importante como quimioatrayente de estas células.

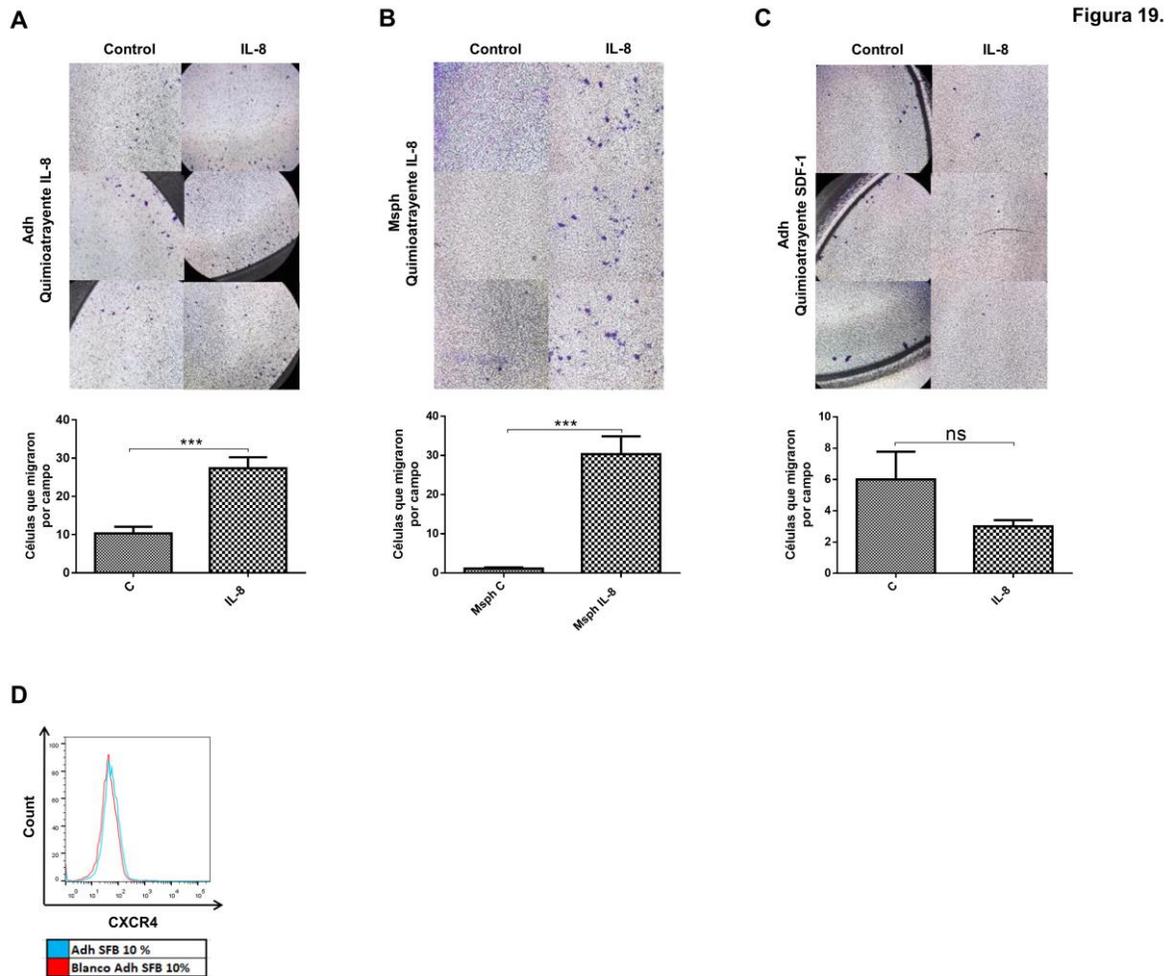


Figura 19. Capacidad de migración e invasión de células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

Análisis de invasión celular en el sistema TW, se usó Matrigel para cubrir el compartimiento superior e IL-8 como quimioatrayente en el compartimiento inferior del TW. A) Células adheridas. B) Células aisladas de Msph. C) Análisis de migración celular en el sistema Transwell (TW), SDF-1 en el compartimiento inferior se utilizó como quimioatrayente. D) Expresión de CXCR4 en células adheridas MCF-7 cultivadas en condiciones estándar (SFB 10%).

El factor derivado de las células estromales (SDF-1) también conocido como CXCL12 es una quimioquina, la cual a través de su receptor CXCR4 tiene un papel importante en la quimiotaxis de las células tumorales y la metástasis (Kang *et al.*, 2005). En el cáncer de páncreas se ha observado que la quimioquina CXCL12 (SDF-1) y el receptor CXCR4 están asociados con la capacidad de invasión y la metástasis (Zhang *et al.*, 2018). Se evaluó la

capacidad de migración de las células adheridas inducidas previamente con IL-8 usando como quimioatrayente SDF-1; se encontró que un número muy reducido de células tenían la capacidad de migrar en respuesta a SDF-1 (Figura 19C). Estos resultados sugieren que SDF-1 no tiene efecto sobre la capacidad de migración de las células adheridas inducidas con IL-8, ni sobre las células control. El análisis de la expresión de CXCR4 en las células cultivadas en condiciones estándar (SFB 10%), mostró que las células MCF-7 no expresan CXCR4 de manera basal (Figura 19D).

6.3.2. Las células provenientes de mamoesferas inducidas previamente con IL-8 son resistentes al tratamiento con Paclitaxel (PLX) y Doxorrubicina (DOX).

En la actualidad las opciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer de seno dependen de las características biológicas del tumor: grado, compromiso ganglionar, estatus de los receptores de estrógenos, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/c-neu), entre otros (Lovitt, Shelper and Avery, 2018). El paclitaxel (PLX) un agente antimitótico y la doxorrubicina (DOX) un intercalante del DNA, son agentes quimioterapéuticos de primera línea usados para tratar pacientes con esta patología (Lovitt, Shelper and Avery, 2018) (Gupta, Gupta and Srivastava, 2019). Originalmente la identificación de agentes antitumorales, se ha basado en su capacidad de eliminar las células con altas tasas proliferativas; sin embargo, estudios recientes han propuesto que no todas las células presentan las mismas tasas de proliferación y que algunas células presentan propiedades tipo *stem* (CSC), las cuales se caracterizan por ser quiescentes y por contribuir al fracaso del tratamiento y a la recurrencia tumoral (Kim and Alexander, 2014).

Para comparar el efecto citotóxico del PLX y DOX, las células adheridas y las mamoesferas fueron expuestas a varios rangos de concentraciones 0,5-1 μ M para PLX y 0.5-2 μ M para DOX. La viabilidad celular se midió con MTT en las células adheridas y en células aisladas de mamoesferas (Figura 20A y 20B). La absorbancia de las células tratadas con DMSO fue usada para normalizar los datos. Se observó diferentes respuestas en las células adheridas y en las células aisladas de mamoesferas: el tratamiento con PLX y DOX de las células adheridas tratadas con IL-8 no mostró una reducción significativa en su viabilidad celular. Las células adheridas control e inducidas con IL-8 presentaron porcentajes de viabilidad celular similares. La evaluación del efecto del PLX y DOX sobre las células aisladas de las

mamoesferas, mostró que las células provenientes de mamoesferas previamente tratadas con IL-8 fueron más resistentes al tratamiento con estos dos agentes, incluso a concentraciones altas; contrario a lo observado en las células provenientes de mamoesferas control, en las cuales se observó, una reducción de la viabilidad en un 50% (Figura 20B).

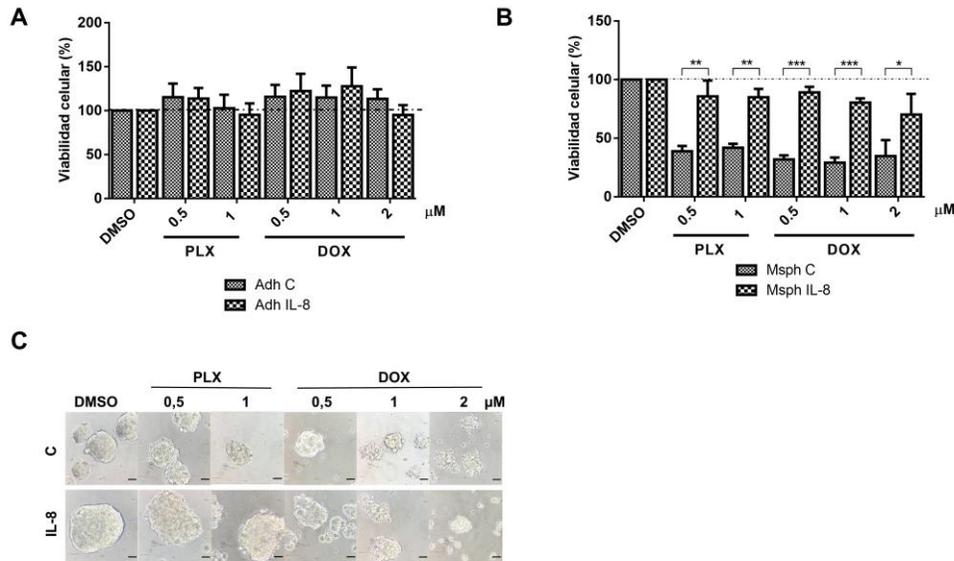


Figura 20. Quimiorresistencia en células Adh y células aisladas de Msph tratadas o no con IL-8.

Efecto citotóxico del Paclitaxel (PLX) y Doxorubicina (DOX). **A)** Porcentaje de viabilidad celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PLX y DOX en células adheridas. **B)** Porcentaje de viabilidad celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PLX y DOX en células aisladas de Msph. **C)** Microscopía de campo claro de las Msph en el día 4 de tratamiento.

La evaluación de la estructura de las mamoesferas en el día 4, mostró que el tratamiento con PLX y DOX, alteró la forma de éstas, perdiendo el contorno por la presencia de protuberancias. En las concentraciones mayores de DOX el efecto fue mayor sobre la configuración de la mamoesfera, siendo más acentuado en las mamoesferas control con DOX 2 μM, a esta concentración se observaron estructuras similares a racimos de uvas (Figura 20C). Estos resultados sugieren que la IL-8 promueve la quimiorresistencia de las células tumorales.

6.3.3. La capacidad de migración de las células adheridas y las células aisladas de mamoesferas se reduce a medida que aumentan las selecciones.

Las células *stem* además de su capacidad de autorrenovación, tienen una habilidad natural para migrar. En las primeras etapas de la embriogénesis, las células *stem* migran largas distancias, se establecen en nuevas ubicaciones y se especializan. Una vez formados los tejidos y órganos, las células *stem* retienen su capacidad de migrar, la cual es activada con la presencia de los estímulos adecuados. En la actualidad hay un nuevo concepto que postula la existencia de dos formas de CSC durante la progresión tumoral: CSC estacionarias y CSC móviles (CSC migratorias MCSC), estas últimas son capaces de diseminarse y formar colonias metastásicas en cáncer de colon (Brabletz *et al.*, 2005). Las MCSC se dividen asimétricamente, generando progenie diferenciada capaz de proliferar y comenzar un nuevo tumor en la nueva localización (Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, Lin J, Tan S, Tian Y, Liao Q, 2017).

Las células adheridas y las mamoesferas previamente inducidas con IL-8 fueron sometidas a tres procesos de selección mediante migración usando como quimioatrayente SFB al 20% (Figura 21A). En el primer proceso de migración (Migr #1) se observan células individuales migrando (Figura 21B), a medida que las células se sometían a un nuevo proceso de selección Migr #2 (Figura 21C) y Migr #3 (Figura 21D) se observó que las células empezaron a migrar formando agrupaciones, lo que sugiere que estas células podrían estar migrando de manera colectiva. La cuantificación no mostró que la capacidad de migración se viera aumentada por el tratamiento previo con IL-8, se observa una disminución en esta capacidad con el paso de las selecciones (Figura 21E).

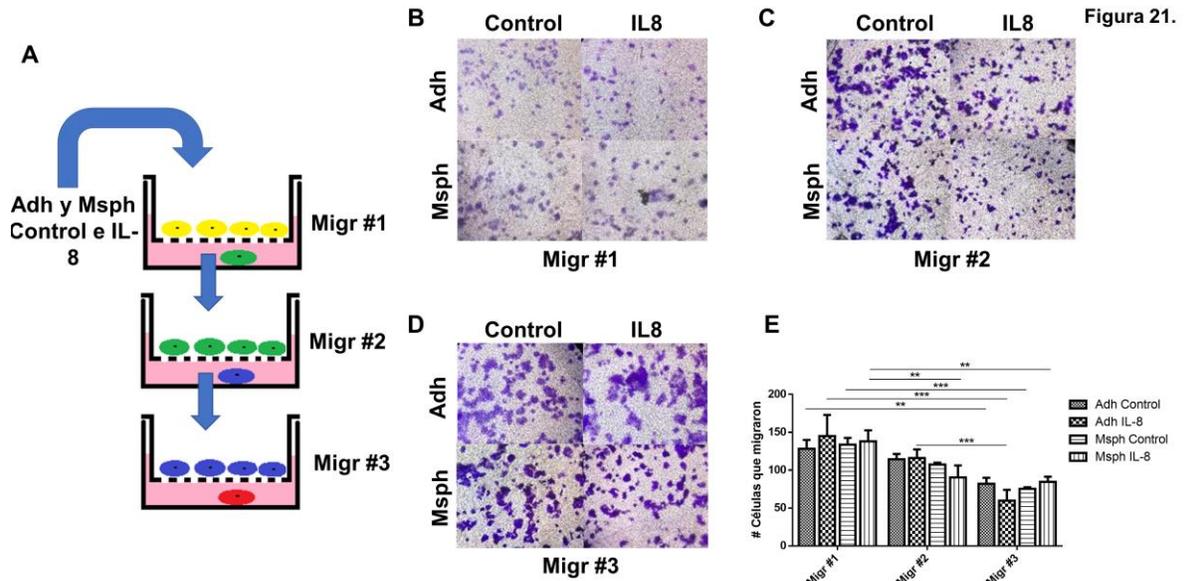


Figura 21. Evaluación de la capacidad de migración de las células adheridas y células aisladas de mamoesferas a través de varios procesos de selección.

A) Esquema proceso de selección de las células adheridas y células aisladas de las mamoesferas previamente tratadas con IL-8. Análisis de migración celular en el sistema Transwell (TW), SFB 20% en el compartimiento inferior se utilizó como quimioatrayente. **B)** Primera selección. **C)** Segunda selección. **D)** Tercera selección. **E)** Cuantificación número de células que migraron a través del TW en las tres selecciones.

7.DISCUSIÓN

Avances recientes en la investigación del cáncer mostraron que los tumores están conformados por una población heterogénea de células, organizadas de manera jerárquica, estando en la cúspide las células con propiedades *stem*. Se cree que las CSC cooptan muchas características de las células *stem* normales, y que existen paralelos entre estos dos tipos celulares (Ben-Porath *et al.*, 2008). Las CSC, son una población celular minoritaria en los tumores, siendo responsables del crecimiento tumoral, la resistencia al tratamiento, las recaídas, la progresión tumoral y la metástasis (Badve and Nakshatri, 2012) (Tannishtha Reya *et al.*, 2001) (Al-Hajj *et al.*, 2003). Las CSC tienen la capacidad de autorrenovarse y formar todos los linajes celulares presentes en el tumor (Friedmann-Morvinski and Verma, 2014). Su estudio permitirá la implementación de nuevas estrategias terapéuticas, mejorando el pronóstico de los pacientes y reduciendo la metástasis y la recurrencia tumoral (Malhotra *et al.*, 2010) (Lawson *et al.*, 2015).

En particular, el papel de la estimulación crónica de citoquinas proinflamatorias en la promoción de la adquisición de propiedades *stem* por las células tumorales ha sido bien documentado (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017) (Gyamfi *et al.*, 2018), así como el papel de un microambiente senescente en la progresión tumoral (Krtolica *et al.*, 2001) (Lasry and Ben-Neriah, 2015) (Al-Khalaf *et al.*, 2019). Previamente se observó un efecto claro de la IL-8 sobre la ganancia de características particulares asociadas con propiedades *stem* en las células aisladas de las mamoesferas. En estas condiciones de tratamiento, las células MCF-7 una línea celular de cáncer de seno no agresiva, con baja expresión de CD44 y que necesita altas densidades celulares (1×10^6 células) para formar tumores en ratones SCID (Ponti *et al.*, 2005), adquirió características compatibles con un programa de EMT y además de propiedades *stem* (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017). La IL-8 le confiere un fenotipo más agresivo a una línea celular de cáncer de seno Luminal A, la cual es considerada como una línea celular poco agresiva y con una firma de potencia (propiedades *stem*) baja (Ortiz-Montero, Londoño-Vallejo and Vernot, 2017) (Fernando *et al.*, 2011). El análisis del índice de potencia (mRNAsi), ha mostrado que los tumores menos diferenciados tienen un mayor mRNAsi (Zhang *et al.*, 2020).

El MAT de la glándula mamaria está compuesto por diversos tipos celulares: fibroblastos, adipocitos, células endoteliales, células inmunes y células senescentes entre otras, los cuales forman redes de interacción complejas a través de citoquinas, quimioquinas, hormonas entre otras, las cuales inciden de manera importante en el funcionamiento adecuado del órgano (Polyak and Kalluri, 2010). La IL-6 y la IL-8 permiten la comunicación en varias direcciones entre los distintos tipos celulares: las células senescentes a través de la IL-8 promueven un ambiente inflamatorio/tumorigénico, el cual desencadena la activación de los fibroblastos, estos a su vez, promueven la EMT en las células tumorales presentes en la glándula mamaria (Al-Khalaf *et al.*, 2019). Por otro lado los adipocitos promueven la EMT en las células tumorales presentes en la glándula mamaria a través de la secreción de IL-6 (Gyamfi *et al.*, 2018). La progresión tumoral está profundamente influenciada por las interacciones de las células tumorales con su microambiente, y el conocimiento de estas interacciones en el tejido neoplásico y su efecto en la progresión tumoral aún es limitada.

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar fenotípica y funcionalmente las células presentes en las mamoesferas de la línea celular MCF-7 inducidas por la IL-8 en relación a la inducción de la EMT y la adquisición de funciones *stem*. La estimulación con IL-8 indujo un programa parcial de EMT en las células adheridas, alterando su morfología y promoviendo la co-expresión de algunos rasgos epiteliales (E-cadherina y TJP1) y mesenquimales (Vimentina), consistente con un fenotipo híbrido E/M (Jolly *et al.*, 2015) (Nieto *et al.*, 2016). Estudios recientes han demostrado que la EMT es un conjunto de múltiples estados dinámicos entre los fenotipos epiteliales y mesenquimales y no un proceso binario en donde el fenotipo epitelial transita completamente hacia el fenotipo mesenquimal (Nieto *et al.*, 2016) (Pastushenko and Blanpain, 2019). La ejecución de un programa de EMT en las células tumorales ha sido identificado como un impulsor crucial de la progresión tumoral a través de la adquisición de propiedades *stem* por parte de las células que lo ejecutan (Nieto *et al.*, 2016). En particular la vimentina es un importante potenciador de la migración/invasión celular, y su presencia está asociada con la EMT, la progresión del cáncer, y la transformación de las células epiteliales quienes cambian su polaridad apical-basal por una polaridad adelante-atrás con pérdida de uniones célula-célula (Strouhalova *et al.*, 2020).

Para enriquecer las células tumorales con propiedades *stem* (CSC) se usó el ensayo *in vitro* de formación de mamoesferas – cultivo no adherente, el cual permite su identificación, propagación, y estudio para una mejor comprensión de su biología (Dontu *et al.*, 2003) (Ponti *et al.*, 2005). Dado que la fracción celular que sobrevive a la anoikis tiene propiedades similares a las células *stem* (Dontu *et al.*, 2003) (Akrap *et al.*, 2016) (Bailey *et al.*, 2018), nosotros asumimos que el pretratamiento con IL-8 y luego la inducción a formar mamoesferas, podía favorecer la adquisición de características particulares de las células *stem* por parte de las células MCF-7. El tratamiento previo con IL-8 de las células MCF-7 promovió un aumento en su capacidad de formación de mamoesferas, las cuales se caracterizaron por presentar tamaños mayores a los presentados por las células control. Las diferencias observadas en los tamaños de las mamoesferas, entre las células control y las previamente tratadas con IL-8, puede reflejar el tipo de célula que les dió origen, mamoesferas pequeñas se originan de células progenitoras, y mamoesferas grandes se originan de células con propiedades *stem* (Dey *et al.*, 2009). Consistente con el análisis de retención del colorante CFSE dentro de las mamoesferas, donde las células previamente tratadas con IL-8 e inducidas a formar mamoesferas, muestra una mayor presencia de señales positivas, lo cual esto se relaciona con una menor tasa de proliferación en estas células y un estado más quiescente, el cual está asociado con un fenotipo más *stem*.

El programa parcial de EMT adquirido por las células adheridas se mantuvo y fue potenciado en las mamoesferas. Las células aisladas de las mamoesferas presentaron alta expresión de SNAI2, ZEB1 y baja expresión de E-cadherina. El aumento en la expresión de estos dos FTs está estrechamente relacionada con la EMT y la adquisición de fenotipos más agresivos por parte de las células tumorales. La sobreexpresión de SNAI2 ha sido asociada con: mal pronóstico, fenotipos invasivos, tumores más agresivos y baja tasa de respuesta clínica a los tratamientos (Camp *et al.*, 2011) (Haslehurst *et al.*, 2012) (Li *et al.*, 2015). Por su parte la sobreexpresión de ZEB1 se relaciona con la resistencia a medicamentos, proliferación y metástasis. ZEB1 es un regulador importante de la plasticidad de las células tumorales, su activación permite que una célula tumoral cambie de un estado no-CSC a un estado CSC. Las células tumorales diferenciadas (no-CSC) mantienen el promotor de ZEB1 en una configuración de cromatina bivalente, lo cual le permite responder a los estímulos del microambiente activando su expresión. Esta

respuesta se da por un cambio en la configuración de la cromatina que aumenta la transcripción de ZEB1 promoviendo un cambio de estado de no-CSC a CSC, la interconversión entre los estados, es un proceso dinámico (Chaffer *et al.*, 2013). En las células de tipo luminal como lo es la línea celular MCF-7 el promotor de ZEB1 normalmente se encuentra en un estado reprimido permitiendo el mantenimiento del fenotipo epitelial, sin embargo, como se vio aquí, la IL-8 es capaz de alterar su expresión.

Curiosamente, aunque el mRNA de la E-cadherina se redujo en las mamoesferas previamente tratadas con IL-8, el análisis de la proteína mostró que esta estaba sobrerregulada, lo que sugiere la persistencia de células híbridas en las mamoesferas (Nieto *et al.*, 2016), lo cual lleva a consideraciones particulares en relación a la regulación de la expresión de la E-cadherina dentro de las mamoesferas. Cabe notar, que se ha encontrado mayor plasticidad y tumorigenicidad en células híbridas con fenotipos más epiteliales (Grosse-Wilde *et al.*, 2015) (Vernot, 2020). Se ha establecido que células tumorales con fenotipo epitelial también pueden presentar propiedades *stem*, esto demuestra que no es necesaria la adquisición de un fenotipo mesenquimatoso para la adquisición de propiedades de células *stem* por parte de las células tumorales (Sarrío *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha visto que la expresión de la E-cadherina es importante para la formación de esferas (Powan *et al.*, 2017) (Smyrek *et al.*, 2019), y en este contexto podría ser importante para el mantenimiento del fenotipo híbrido de las células dentro de las mamoesferas. Evidencia reciente muestra que la expresión de E-cadherina es importante para la activación de rutas de señalización de supervivencia en condiciones no adherentes (Powan *et al.*, 2017). Distinto a lo que ocurre con la línea celular MDA-MB-231, la cual es incapaz de formar mamoesferas, tal vez por la ausencia de E-cadherina. Se ha establecido que la habilidad para formar mamoesferas depende de la expresión de E-cadherina (Iglesias *et al.*, 2013). La mayoría de las líneas tumorales de cáncer de seno capaces de formar mamoesferas expresan E-cadherina en su superficie celular. Cuando se elimina su expresión en las células MCF-7, se anula la capacidad de formar mamoesferas de esta línea celular. La reexpresión de E-cadherina en las células SKBR3 conlleva a que estas células adquieran la capacidad de formar mamoesferas, una línea celular incapaz de formar estas estructuras (Iglesias *et al.*, 2013). Esto muestra la importancia de la E-cadherina en la capacidad de formación de mamoesferas y como esta proteína asociada con fenotipos epiteliales, puede estar relacionada con células con propiedades *stem*.

Recientemente, se ha demostrado que la expresión forzada de una combinación de cuatro FTs: Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc es capaz de reprogramar fibroblastos generando células *stem* pluripotentes, las cuales tienen propiedades similares a las células *stem* embrionarias; lo que sugiere que la expresión de estos FTs es indispensable para el mantenimiento de las propiedades *stem* (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Aunque la autorrenovación, según lo evaluado por el ensayo de formación de mamoesferas, aumentó con el tratamiento con IL-8 en la primera generación, esta no se mantuvo en ensayos consecutivos, al contrario, con lo esperado se observó una reducción en la capacidad de autorrenovación después de la primera generación. Esto en concordancia con la reducción encontrada en la expresión de los genes implicados en la autorrenovación (Bmi1, GATA3 y RunX1), en la reprogramación celular (Oct4) y la ausencia de expresión de los genes Klf4 y Sox2 en las mamoesferas inducidas previamente con IL-8. La expresión alta de Klf4 en las células adheridas tratadas con IL-8 puede sugerir que en el cultivo adherente se enriquece la capacidad de reprogramación celular; lo que promueve la activación de Nanog, que luego aumenta su expresión en las mamoesferas, manteniendo un fenotipo más *stem* por parte de estas células.

Klf4 es importante en la regulación de la capacidad de autorrenovación, el mantenimiento de la pluripotencia e inhibición de la diferenciación celular. Klf4 se une directamente a la región promotora de Nanog regulando su expresión, la expresión de Nanog previene la diferenciación de células *stem* embrionarias (Zhang *et al.*, 2010). Son entonces Nanog, Oct4, Klf4 y Sox2 importantes reguladores de las propiedades de células *stem*, los cuales presentan una expresión alterada dentro de las mamoesferas que podrían estar afectando la capacidad de autorrenovación en estas células. Nanog es un potente inductor de pluripotencia, lo que contribuye a la generación de CSC (Zhang *et al.*, 2016). Los tumores poco diferenciados muestran una sobreexpresión preferencial de genes normalmente enriquecidos en las células *stem*. La expresión de Nanog se observa con frecuencia en tumores mal diferenciados. En el cáncer de seno se observa en tumores receptor de estrógeno y progesterona negativos de alto grado, a menudo del subtipo basal con mal pronóstico clínico (Ben-Porath *et al.*, 2008).

Estos resultados son consistentes con estudios previos que muestran que las células iniciadoras de las mamoesferas tienen propiedades *stem* con potencial limitado de autorrenovación las cuales dan origen a progenitores en varios estados de diferenciación dentro de la mamoesfera (Dontu *et al.*, 2003). Someter las células aisladas de mamoesferas a varias rondas de cultivo en condiciones no adherentes puede alterar la regulación de rutas de señalización asociadas con autorrenovación y diferenciación celular. Estudios previos de caracterización de mamoesferas, mostraron que después de varias generaciones aumentaba el número de células senescentes presentes en las mamoesferas y que en las generaciones más tardías no se detectaba actividad de la enzima hTERT. En este contexto las células *stem* dentro de las mamoesferas pueden volverse senescentes o la alteración de su nicho puede tener consecuencias desfavorables alterando así su capacidad de autorrenovación (Dey *et al.*, 2009).

Además, las células obtenidas de las mamoesferas tienen menor capacidad de crecimiento clonogénico en comparación con las células adherentes. En concordancia, se encontró que las células epiteliales provenientes de mamoplastias de reducción sujetas al ensayo de formación de mamoesferas tienen el potencial clonogénico reducido, así como la capacidad de diferenciación adipogénica (Pece *et al.*, 2010). Por lo tanto, se mostró un importante deterioro en las propiedades *stem* inducidas por el tratamiento previo con IL-8. La desregulación de las funcionalidades de las células *stem*/progenitoras puede también ser importante en la carcinogénesis (Dontu *et al.*, 2003).

El análisis de la expresión de CD44 y CD24 en las células adheridas y en las células aisladas de mamoesferas mostró que la IL-8 no tenía un efecto importante sobre su expresión. El análisis de la coexpresión de CD44 y CD24 mostró la presencia de células con fenotipo CD44⁻CD24⁺ principalmente, el precepto por varios años ha sido que las células con fenotipos más *stem* CD44⁺CD24^{Low/-} componen la población de células con capacidad de crecer en condiciones no adherentes. Se ha establecido una estrecha relación entre la capacidad de formar esferas y el fenotipo CD44⁺CD24^{Low/-} (Dey *et al.*, 2009). Sin embargo, aquí se mostró que células con diferente fenotipo, principalmente CD44⁻CD24⁺ tienen la capacidad de formar mamoesferas. Lo que lleva a dos puntos importantes a tener en cuenta: uno, estos marcadores pueden no ser los adecuados para el estudio de las

células con propiedades *stem* y/o dos, la plasticidad intrínseca de las células tumorales les permite transitar por varios estados no identificables *in vitro*, lo cual permite que una célula inicialmente sin propiedades *stem* tenga la capacidad de crecer en condiciones de anoikis sin cambio en el perfil de expresión de sus marcadores de superficie (Iglesias *et al.*, 2013).

Tanto las células adheridas como las células aisladas de las mamoesferas presentan fenotipos heterogéneos los cuales cambian de acuerdo al contexto en el que son cultivadas 2D o 3D. El análisis de los parámetros FSC-A y SSC-A reveló diferencias en el tamaño y la complejidad tanto de las células adheridas como de las células aisladas de las mamoesferas, lo cual permitió la identificación de dos poblaciones celulares. Las células adheridas están compuestas principalmente por población FSC-High, y las células de las mamoesferas están compuestas principalmente por población FSC-Low. En glioma se ha encontrado que las células con propiedades *stem* corresponden a menos del uno por ciento de toda la población (Barrett *et al.*, 2012). Barrett *et al.*, 2012 identificó en un subconjunto de gliomas, la presencia de dos poblaciones: Id1 High (células tumorales con alta capacidad de autorrenovación) e Id1 Low (células tumorales con potencial proliferativo, pero capacidad de autorrenovación limitada). Las células Id1 Low generaron tumores más rápidamente, con mayor penetrancia que las células Id1 High, esto señala la importancia de los linajes sin capacidad de autorrenovación, en la progresión de la enfermedad. Las células más tumorigénicas se caracterizaron por presentar marcadores de células progenitoras y capacidad de autorrenovación limitada (Barrett *et al.*, 2012).

La coexpresión de EpCAM y CD49f permite determinar el fenotipo de las células, las células EpCAM⁺/CD49f⁺ corresponden a células *stem*/progenitoras luminales, las células con el fenotipo EpCAM⁺/CD49f⁻ corresponden a células luminales diferenciadas (Visvader, 2009) (Lim *et al.*, 2009). Las mamoesferas están compuestas principalmente con células más diferenciadas EpCAM⁺/CD49f⁻, lo cual explicaría en parte la capacidad reducida de autorrenovación y clonogenicidad de las células aisladas de las mamoesferas. Estudios previos de neuroesferas mostraron que menos del 6% de la población tumoral total tenía capacidad de autorrenovación por varias generaciones, esto muestra que solo una pequeña fracción de las células dentro de las neuroesferas poseen una amplia capacidad de autorrenovación (Louis *et al.*, 2008).

Estudios anteriores han revelado que las mamoesferas son grupos de células multidiferenciadas. Estas diferencias en los fenotipos celulares dentro de las mamoesferas podrían estar relacionados con el intercambio continuo de información entre las células. Investigaciones recientes muestran la presencia de estructuras parecidas a los microtúbulos, las cuales podrían mediar la comunicación de las células dentro de la mamoesferas (Huang *et al.*, 2018).

La IL-8 potencia la capacidad de migración e invasión de las células adheridas y de las células aisladas de mamoesferas, lo que podría estar catalizado por la adquisición del fenotipo híbrido. Se ha visto que células tumorales pueden hacer metástasis sin perder por completo la morfología epitelial y/o alcanzar completamente rasgos mesenquimales, lo cual permite migración colectiva, un tipo de migración observado en células tumorales circulantes presentes en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer de pulmón (Lecharpentier *et al.*, 2011), seno y próstata (Armstrong *et al.*, 2011), las células que migran de manera colectiva son más resistentes a la apoptosis y son más metastásicas, comparado con las células que migran de manera individual (Jolly *et al.*, 2015).

De otra parte, se encontró que las mamoesferas previamente tratadas con IL-8 son más resistentes a los tratamientos con Paclitaxel y Doxorubicina, comparado con las mamoesferas control. Estos resultados están en concordancia con trabajos previos que mostraron que la IL-8 induce un aumento en la capacidad de migración, invasión y quimiorresistencia a Oxaliplatin en cáncer de colon y gástrico (Ning *et al.*, 2011) (Kuai *et al.*, 2012).

Estos hallazgos muestran que una población celular dentro de las mamoesferas previamente tratadas con IL-8, es capaz de adquirir propiedades y funciones nuevas que le favorecen para aumentar su capacidad migratoria/invasiva y su resistencia a los agentes quimioterapéuticos. Esta situación se parece bastante a lo que probablemente sucede *in vivo*, un MAT capaz de impulsar varios estados de diferenciación, contribuyendo a la

heterogeneidad celular, presencia tanto de poblaciones celulares terminalmente diferenciadas (no-CSC), como también poblaciones celulares con propiedades *stem*, éstas últimas responsables de la resistencia a medicamentos y propagación tumoral. Hemos demostrado aquí, que la línea de cáncer de seno no agresiva MCF-7 adquiere selectivamente características particulares y relevantes de células *stem* importantes en la progresión del cáncer cuando es tratada con IL-8. Esto sugiere que la evaluación global de los índices de potencia, aunque útil, no muestra realmente las capacidades funcionales que las células pueden adquirir bajo una estimulación particular, como puede suceder en el MAT.

Interesantemente, en algunos casos estas propiedades asociadas con fenotipo *stem* se vieron gravemente afectadas, pero en otras se incrementaron, lo que sugiere una modulación diferencial de estas propiedades por la IL-8.

8. CONCLUSIONES

1. La IL-8 tiene un efecto heterogéneo sobre las características morfológicas, la adquisición de un programa parcial de EMT en las células de la línea celular MCF-7, el cual puede estar determinado por las características intrínsecas de las células que hace que las células respondan de manera diferencial al estímulo.
2. Las mamoesferas son estructuras complejas compuestas por grupos heterogéneos de células en distintos estados de diferenciación, en los que la IL-8 potencia la capacidad de migración, invasión y quimiorresistencia.
3. Las células MCF-7 están compuestas por dos poblaciones celulares las cuales difieren en su proporción, tamaño y complejidad dependiendo del tipo de cultivo adherente o no adherente.
4. El cultivo no adherente y el tratamiento con IL-8 disminuyen la capacidad de autorrenovación y reprogramación celular.
5. La capacidad de diferenciación multilínea disminuye en las células aisladas de las mamoesferas, mostrando que las células presentes en las mamoesferas tienen fenotipos más diferenciados.
6. Las células presentes en las mamoesferas tienen un potencial clonogénico reducido.

9.PERSPECTIVAS

- ✓ Establecer un sistema de cultivo no adherente con adición de elementos del estroma como fibroblastos, para profundizar en las interacciones entre células y su efecto en la funcionalidad de las células tumorales, simulando mejor lo que sucede *in vivo*.
- ✓ Establecer los cambios epigenéticos que tienen lugar en las células de las mamoesferas tratadas con IL-8 y su efecto sobre los distintos fenotipos observados.
- ✓ Identificar los mecanismos biológicos asociados con la quimiorresistencia observados en las células asiladas de las mamoesferas tratadas previamente con IL-8.

10. PRODUCTOS ACADÉMICOS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ORIGINALES

Ospina-Muñoz N, Vernot JP. **Partial acquisition of stemness properties in tumorspheres obtained from interleukin-8-treated MCF-7 cells.** *Tumour Biol.* 2020 Dec;42(12):1010428320979438. doi: 10.1177/1010428320979438. PMID: 33325322. (ANEXO 1)

Moon H-r, Ospina-Muñoz N, Noe-Kim V, Yang Y, Elzey BD, Konieczny SF, et al. (2020). **Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform.** *PLoS ONE* 15(6): e0234012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012> (ANEXO 2)

SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2. Bogotá (Colombia). Noviembre 1-3 de 2018. Presentación Poster: “La Interleuquina 8 promueve la transición epitelio-mesenquimal, la adquisición de propiedades *stem* y la agresividad tumoral en la línea celular MCF-7”. Reconocimiento como **MEJOR PRESENTACIÓN PÓSTER** en el área temática de Salud Humana y Animal. (ANEXO 3)

ANEXO 1.



Original Article

Partial acquisition of stemness properties in tumorspheres obtained from interleukin-8-treated MCF-7 cells

Natalia Ospina-Muñoz¹  and Jean-Paul Vernot^{1,2} 

Abstract

The interleukin-8 is an important regulator of the tumor microenvironment, promoting the epithelial–mesenchymal transition and the acquisition of stem-like cell properties in cancer cells. The tumorsphere-formation assay has been used for

**Tumor
Biology**

Tumor Biology
December 2020: 1–14
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1010428320979438
journals.sagepub.com/home/tub


RESEARCH ARTICLE

Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform

Hye-ran Moon¹, Natalia Ospina-Muñoz^{1,2}, Victoria Noe-Kim¹, Yi Yang³, Bennett D. Elzey^{4,5}, Stephen F. Konieczny^{3,5}, Bumsoo Han^{1,5,6*}

1 School of Mechanical Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN, United States of America, **2** Cellular and Molecular Physiology Group, School of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia, **3** Department of Biological Science, Purdue University, West Lafayette, IN, United States of America, **4** Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, United States of America, **5** Purdue Center for Cancer Research, Purdue University, West Lafayette, IN, United States of America, **6** Weldon School of Biomedical Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN, United States of America

* bumsoo@purdue.edu



OPEN ACCESS

Citation: Moon H-r, Ospina-Muñoz N, Noe-Kim V, Yang Y, Elzey BD, Konieczny SF, et al. (2020) Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform. PLoS ONE 15(6): e0234012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012>

Editor: Jonghoon Choi, Chung-Ang University College of Engineering, REPUBLIC OF KOREA

Received: February 26, 2020

Accepted: May 15, 2020

Published: June 16, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012>

Copyright: © 2020 Moon et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Abstract

Understanding progression of breast cancers to invasive ductal carcinoma (IDC) can significantly improve breast cancer treatments. However, it is still difficult to identify genetic signatures and the role of tumor microenvironment to distinguish pathological stages of pre-invasive lesion and IDC. Presence of multiple subtypes of breast cancers makes the assessment more challenging. In this study, an *in-vitro* microfluidic assay was developed to quantitatively assess the subtype-specific invasion potential of breast cancers. The developed assay is a microfluidic platform in which a ductal structure of epithelial cancer cells is surrounded with a three-dimensional (3D) collagen matrix. In the developed platform, two triple negative cancer subtypes (MDA-MB-231 and SUM-159PT) invaded into the surrounding matrix but the luminal A subtype, MCF-7, did not. Among invasive subtypes, SUM-159PT cells showed significantly higher invasion and degradation of the surrounding matrix than MDA-MB-231. Interestingly, the cells cultured on the platform expressed higher levels of CD24 than in their conventional 2D cultures. This microfluidic platform may be a useful tool to characterize and predict invasive potential of breast cancer subtypes or patient-derived cells.

Introduction

Breast cancers often start from ductal carcinoma *in situ* (DCIS), in which abnormal epithelial cells are present in the mammary ducts of breast tissues. [1, 2] This pre-cancerous lesion progresses to invasive ductal carcinoma (IDC), which will need major treatments including chemotherapy, radiation, and surgical therapies. [3–5] Understanding and characterization of the transition of DCIS into IDC can significantly improve the treatment and management of breast cancers. Extensive studies have been performed to identify both genetic and

Funding: This work was partially supported by NIH HHSN261201400021C, a CTR Award from Indiana CTSI funded in part by UL1TR000006 from NIH, a Phase I grant from the Purdue University Center for Cancer Research, and a grant from Walther Cancer Foundation. The confocal microscopy was by a Shared Resource Award from the Purdue University Center for Cancer Research, NIH grant P30CA023168. Natalia Ospina-Muñoz was partially supported by COLCIENCIAS. National PhD, Call 647 Year 2015.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

environmental drivers and markers of the progression from DCIS to IDC, as reviewed elsewhere. [1, 2, 6] However, key drivers of this disease's progression along with both pathological and molecular markers remain elusive. Moreover, key markers vary depends on breast cancer subtypes, which are poorly understood.

Invasion of malignant epithelial cells from a mammary duct is a complex process, which consists of cell growth, epithelial-mesenchymal-transition (EMT), cell invasion, and migration. During this process, various growth factors and enzymes are thought to be involved. [7, 8] It has been reported that notable remodeling of the surrounding extracellular matrix (ECM) accompanies this process. [9–11] Although changes in gene expressions of various cell types in DCIS and IDC have been studied, [10, 11] many studies have reported very similar gene expression levels in both a pre-invasive lesion and IDC. DCIS shows similar genetic aberrations and intralesional heterogeneity to synchronous IDC. [12–15] This makes it challenging to identify relevant genetic signatures that help distinguish pathological stages between DCIS and IDC.

Furthermore, invasive and metastatic behaviors are largely varied depending on the cancer subtypes. Breast cancers have been classified into several subtypes based on histological contexts, genetic profiles, or molecular aberrations. [16–19] Within a histologically identical tumor type, particularly IDC, clinical outcomes have shown drastically different. [16, 18] For this reason, several molecular subtypes of breast cancer defined by gene expression profiles including luminal A, luminal B, HER-2 enriched, basal-like, and triple-negative breast cancer (TNBC) type have aroused to improve the therapeutic strategies. Specifically, TNBC, which lacks expression of hormone epidermal growth factor receptor 2 (HER-2), ER and PR, has drawn enormous attention due to its aggressiveness. [18, 20] Even within the TNBC subgroup, it has shown heterogeneity in invasive behaviors and clinical outcomes. [18, 21] However, quantitative comparison of subtype-specific invasion process has been barely studied due to lack of the capable models. It is highly desired to develop subtype-specific invasion models that can provide patient-specific or subtype-specific treatment planning.

One of the most crucial gaps in elucidating mechanisms of the complex invasion process is the lack of a relevant tumor model capable of recapitulating series of events that occur during the local invasion of cancer cells. Conventional 2D cell cultures are easy to use but limited to representing cellular activity during this progression due to the lack of relevant environmental cues present in the tumor environment. In-vivo models, such as xenografts, [8, 9] provide a better representation of human breast cancers, but it is difficult to control environmental conditions and recapitulate anatomical details of the IDC microenvironment. Thus, new tumor models are highly desired to be capable of recapitulating the interactions of epithelial cells and ECM while maintaining the controllability of environmental cues. In this context, microfluidic tumor models offer significant advantages in enabling recapitulation of the tumor microenvironment through precise control of physiological cues. [22, 23] Several microfluidic models have been recently used to characterize subtype-specific drug response of breast cancers, [24–26] and subtype-specific metastasis to bone. [27] Regarding DCIS, several microfluidic models have been proposed to study the effects of fibroblast on the invasion of cancer and non-cancerous epithelial cells of breast tissues. [28–30] The platform in [29] has microchannels where fibroblasts are cultured in collagen to induce chemical cues on the epithelium of the duct. In addition to the DCIS, an *in vitro* microfluidic tumor model for the later stage IDC has developed to investigate invasion characteristics of the breast cancer cells. Despite the advances in developing *in vitro* tumor models, a lack of a reliable model to explore the subtype-specific features of the breast cancer invasion is available.

In this study, we developed an *in vitro* model of IDC and used to quantify subtype-specific invasion characteristics of three different human breast cancer cell lines—MCF-7, MDA-MB-

231, and SUM-159PT. This IDC-on-chip model is a microfluidic platform in which a breast cancer epithelial cell duct is surrounded with three-dimensional (3D) perfused collagen matrix. This model is capable of closely mimicking pathobiology of cancer cells, including growth, epithelial-mesenchymal transition (EMT), local invasion, and associated signaling pathways. Cancer cell lines that are utilized in this study are critical molecular subtypes of breast cancers. Since the developed model intends to mimic IDC which is a later stage of the disease after DCIS, the three subtypes of breast cancer cell lines were selected accordingly. MCF-7 cell line is the Luminal A subtype expressing estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). Both MDA-MB-231 and SUM-159PT are TNBCs. [31, 32] These two cell lines are further characterized as mesenchymal stem-like TNBC subtypes. [33, 34] Subtype-specific local invasion characteristics of these cells into the surrounding matrix were assessed quantitatively.

Materials and methods

Cells and reagents

Three types of human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, and SUM-159PT) were used. MCF-7 cells were maintained in a culture medium (DMEM/F12, Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 µg/mL penicillin/ streptomycin. The culture medium for MDA-MB-231 cells was supplemented with 10% FBS. SUM-159PT cells, obtained from Asterand (Detroit, MI), were cultured in a medium (Ham's F-12, Invitrogen) supplemented with 5% FBS, 10mM HEPES, 5µg/ml insulin, and 1µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). All cells were cultured in 75 cm² T-flask at 37°C and 5% CO₂. Cells were harvested for further experiments using 0.05% trypsin and 0.53 mM EDTA when the cells reached 70–80% confluence.

Microfluidic invasion assay

The IDC-on-chip was developed to replicate a mammary duct with an intact epithelial cell lining that is supported and surrounded by a collagen matrix as shown in Fig 1A. The microchannel (width and height = 900 µm, length = 10 mm) was fabricated with poly-dimethylsiloxane (PDMS) using a micromachined mold. The channel was initially filled with type I collagen. Prior to gelation, a lumen structure, to represent the mammary duct, was generated along the microfluidic channel using viscous fingering as described previously. [29, 35] Briefly, a solution of 6.0 mg/mL Type I collagen (Corning, NY) was then prepared. Approximately 20 µL of collagen solution was added to the inlet port of the device so that the channel was filled with collagen. Then, a single droplet of 20 µL of culture medium was placed at the inlet causing a duct structure to form through the collagen via viscous fingering. The devices were then incubated at 37°C for 15–20 minutes for gelation of the collagen solution to occur. Once the ductal structure was formed, 10 µL of cancer cell suspension was added to the inlet of the device to seed cells on the lumen, which was subsequently incubated at 37°C and 5% CO₂. Culture medium was changed every 24 hours until the conclusion of the experiment.

Invasion characteristics and confocal microscopy

The extent of local invasion of cancer cells was quantified via image analysis using ImageJ (NIH, Bethesda, MD). The brightfield images obtained were further analyzed to quantify local invasions. The local invasion was quantified by counting sprouting from the lumen boundary into the adjacent collagen matrix. The number and length of sprouting from the lumen were measured. The number of sprouting sites was normalized across all samples, yielding a "local

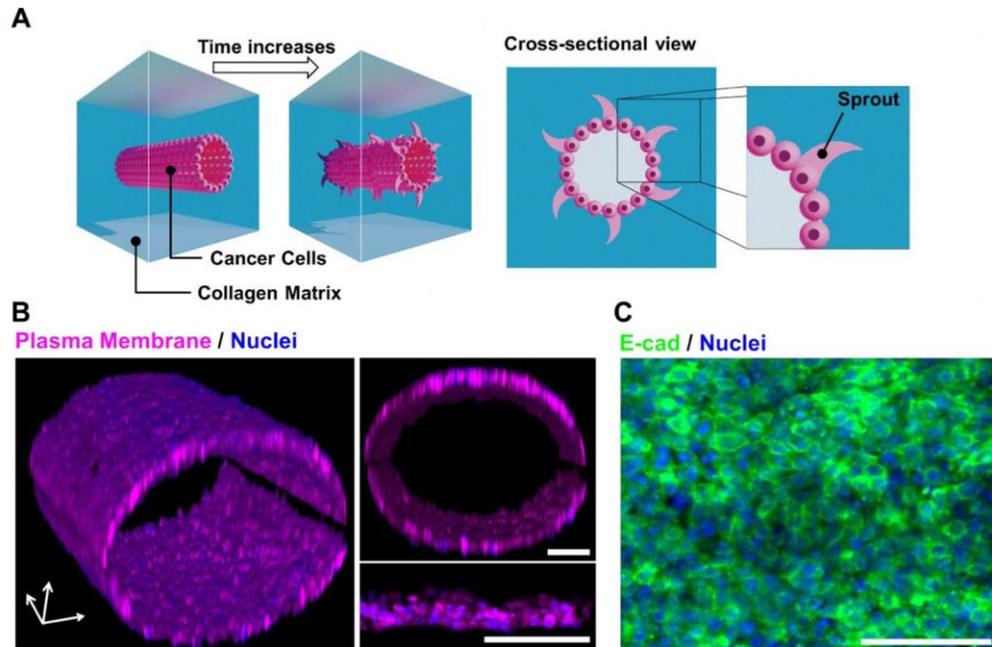


Fig 1. Invasive ductal carcinoma (IDC) on chip. (A) Microanatomical replication of IDC-on-chip. Epithelial cancer cells at the lining of the lumen structure formed through collagen gel. (B) 3D reconstruction of MCF-7 lumen structure in IDC-on-chip platform and cross-sectional images. Magenta stains are plasma membrane and blue are nuclei. (C) E-cadherin (E-cad, green) immunostaining of MCF-7 duct with nuclei (blue). Scale bars indicate 100 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012.g001>

invasion score" between 0 and 1. Mean sprout length was determined as the straight-line distance between the base and tip of the local invasion site.

Prior to terminal confocal microscopy, cells in IDC-on-chip were labeled for cell nuclei (Hoechst 33342, Sigma Aldrich, MI) and plasma membrane (Deep Red Cell Mask, Life Technologies, CA). The stained samples were fixed with 10% formaldehyde. Z-stacked confocal images were acquired with 2.5–4 μ m intervals using a confocal microscope (AIR-MP, Nikon, Japan). At each focal plane, fluorescence illuminations were obtained. To highlight the invasive configuration of the cells, fields of view of confocal fluorescence were reconstructed as 3D.

Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence microscopy, the IDC-on-chip samples were pre-cultured for three days. One day prior to immunostaining, the samples were fixed by placing a few droplets of 10% buffered formalin (MACRON, Cat:5016–08, PA) at the inlet until the culture medium was completely replaced. After fixation, samples were washed three times with 1X PBS (Life Technologies, CA) and stored with PBS reservoirs at both inlet and outlet ports to prevent dehydration, then placed them in the refrigerator at 4°C. Once samples were ready for immunostaining, the samples were permeabilized with (Triton-X) in 1X PBS. Then the samples were blocked with a 10 μ L droplet of 1% BSA and Avidin (Streptavidin) solution by adding it to the inlet of samples and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. The sample was then

washed three times with 1X PBS. For the next step, the primary antibodies, E-cadherin (Abcam, MA) were added to M.O.M. diluent (Vector Laboratory BMK2202) and 4 drops of Biotin solution per 1 mL of diluent at a 1:100 dilution. The solution was applied to the inlet making sure it perfused through the channel then allowed to incubate for 1 hour at room temperature. After washing the channel three times with 1X PBS, a few droplets of the secondary antibody mixture and a biotin-conjugated secondary (goat) antibody (Vector Laboratory BA9200) (1:200) in M.O.M. diluent were introduced to the samples and allowed to incubate for 30 minutes at room temperature. Finally, samples were washed with 1X PBS three times, and then the stained with DAPI (1:200 in M.O.M. diluent) (Invitrogen D1306) and tertiary antibodies of Alexa Fluor 488, then incubated for 20 minutes at room temperature. Samples were washed with PBS three times before imaging.

Histology processing and immunohistochemistry

After culturing for 72 hours, IDC-on-chip samples were incubated with media containing 10 μ M BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) for 1.5 hours and subsequently subjected to fixation in 10% neutral buffered formalin at 4°C overnight. The samples were then filled 15% native page acrylamide gel for maintaining duct structure. The scalpel was used to cut open the PDMS chips and expose the luminal collagen tissue. The samples were then processed, embedded in paraffin, sectioned using standard histological techniques. Sections were deparaffinized and retrieved using the 2100-retriever (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) with antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA). After processing, the samples were further stained for BrdU, Ki67, and N-cadherin.

Flow cytometry analysis

Cell surface analysis was performed to compare the phenotypic changes induced by culturing on the IDC-on-chip platform against that of conventional 2D monolayer culture. Briefly, after 3-day culture, the cells attached to the collagen matrix were retrieved from the IDC-on-chip platform. Then, the samples were treated with 0.5 mg/ml collagenase (Liberase TM, Roche, Indianapolis, IN) and 50 μ g DNase I (Sigma, St. Louis, MO) for 15 min at 37°C with shaking to isolate cancer cells. Collagenase was neutralized with cold culture medium containing 10% calf serum and single cells were isolated. Cells were stained with fluorescently labeled anti-CD24, and anti-CD44 (Biolegend, CA) antibodies for 30 min at 4°C, washed twice and fixed prior to analysis using flow cytometry (LSR II cytometer, Beckton Dickinson, CA).

Statistical analysis

Relevant study groups in each experiment were compared using a two-sample *t*-test. A minimum of three samples was analyzed for each group. The minimum level for statistical significance was $p < 0.05$. Data is reported in the form of mean \pm standard error.

Results

Development of a microfluidic platform to characterize invasion behaviors of three different breast cancer subtypes

The mammary gland is composed of epithelial ductal trees surrounded by a complex stroma. The ducts consist of a layer of epithelial cells in the lining covered by myoepithelial cells and basement membrane (BM) [36]. In the mammary gland, the BM is a specialized laminin-rich form of the extracellular matrix. However, abnormal microenvironments are characterized by the presence of collagen I [36]. The IDC-on-chip was designed to replicate the mammary duct

with an intact epithelial cell lining that is supported and surrounded by collagen I matrix as shown in [Fig 1A](#). The IDC-on-chip was used to evaluate the invasion capacity of three different breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and SUM-159PT. The ductal structure of IDC-on-chip was characterized by reconstructing the confocal fluorescence image of MCF-7 in the IDC-on-chip. In the sample, MCF-7 cells are attached on the tubular surface of the collagen matrix. Stained nuclei and cell plasma membrane clearly demonstrate a ductal structure developed in the IDC-on-chip as shown in [Fig 1B](#). It is noted that the lumen is a cylindrical, hollow structure. MCF-7 cells showed a tightly packed epithelium with mono or double cell layers. The average diameter of the lumen was approximately 500 μm .

To confirm intact adhesion between cells, the expression of E-cadherin was evaluated. The cells in the duct showed a positive expression of E-cadherin. Indeed, the significant signal was observed at the membrane junction between the adjacent cells as shown in [Fig 1C](#), indicating cell-cell adhesion. The ductal structure formed in IDC-on-chip has a micro-anatomical resemblance to human DCIS, which is defined as a neoplastic lesion with proliferative tumoral cells confined to the duct of the breast without invasion of the basement membrane. [\[37\]](#)

MCF-7, MDA-MB-231, and SUM-159PT showed differences in the invasion capacity in the IDC-on-chip

Here, we evaluated invasion characteristics of breast cancer cells by using the 3D *in vitro* structure of IDC-on-chip. The lumen of the duct was lined with MCF-7, MDA-MB-231, and SUM-159PT cells, separately. The platform enabled the observation of the invasion capacity of the cells from the duct into the collagen I (stroma) which resembles what happens *in vivo*. Since the breast cancer cells invade through the ECM in response to its stiffness, cell sprouts indicating invasion in the IDC-on-chip headed outward of the duct. The stiffness of the collagen matrix at 6 mg/mL has been measured at 0.75 ± 0.12 kPa. [\[38\]](#) Representative time-lapsed micrographs are shown in [Fig 2A](#). MCF-7 cells showed an increase in the thickness of the cell ductal layer across 6 days of culture, suggesting the growth of the tumoral cells inside the duct. Additionally, the collagen matrix was preserved across the duct over 6 days while no evident sprouts were formed as in [Fig 2A](#) (i, ii, iii). For MDA-MB-231, sprouts were observed after 3 days of culture ([Fig 2A](#), v) and the number of sprouts increased over time until day 6 ([Fig 2A](#), vi). Interestingly, SUM-159PT showed sprouts from day 1 ([Fig 2A](#), vii), and the number of sprouts massively increased over time. The sprouts were quantitatively represented as local invasion score and local invasion length, which were defined as a frequency of the sprouting sites and a mean length of the sprouts. The quantitative evaluation of the sprouts with the frequency and length illustrates the invasion capacity of each cell line meticulously. On day 1 and day 3, SUM-159PT had a higher invasion score than MDA-MB-231 cells. ([Fig 2B](#)) The length measurement of the sprouts was similar between MDA-MB-231 and SUM-159PT, however, the morphology of the sprouts from SUM-159PT appeared different from the sprouts formed by MDA-MB-231. For SUM-159PT, sprouts had ramifications differently from MDA-MB-231 in which the sprouts looked like an extension of the cytoplasm without ramifications. These results showed differences in the invasion capacity between the different cell lines despite both MDA-MB-231 and SUM-159PT are classified as TNBC.

Different invasion patterns between SUM-159PT and MDA-MB-231

We observed differences in sprout features and the invasion capacity between MDA-MB-231 and SUM-159PT. Specifically, SUM-159PT is highly aggressive compared to MDA-MB-231. To closely look into the invasion capacity of the cell lines, we investigated the confocal fluorescence microscopy images reconstructed in 3D for SUM-159PT ([Fig 3A](#)) and MDA-MB-231

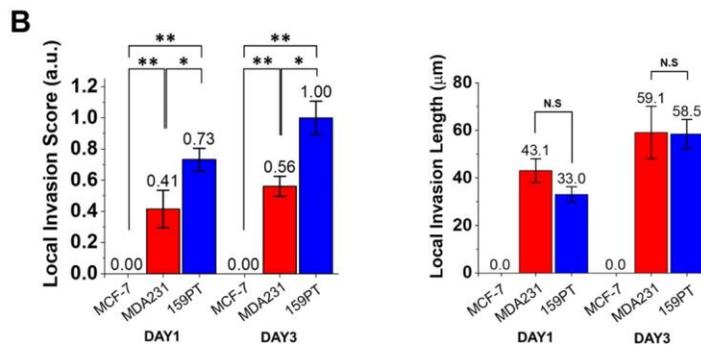
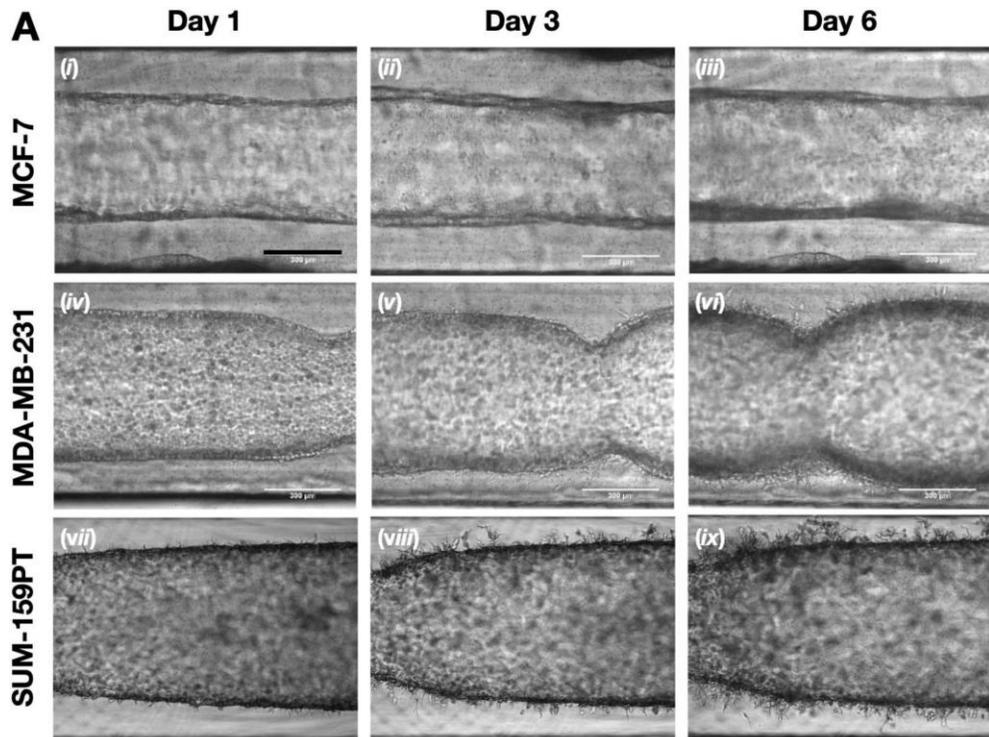


Fig 2. Invasion assay of three subtype-specific breast cancer cell lines in IDC-on-chip. (A) Time-lapse micrographs of MCF-7, MDA-MB-231 and SUM-159PT ducts in IDC-on-chip at day 1, 3 and 6. Scale bars indicate 300 µm. (B) Quantification of local invasion on DAY1 and DAY3. (C) Quantification of local invasion length. MCF-7; MDA231, MDA-MB-231; 159PT, SUM-159PT; Bar; mean ± standard error. N.S.; $p > 0.05$, † ; $p < 0.05$, and ** ; $p < 0.01$ (Student t-test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012.g002>

(S1 File). The duct of SUM-159PT showed protrusions that invaded the collagen as a cluster of cells aligned one after another by forming branches. (Fig 3B). A video clip of the local invasion of SUM-159PT as in S1 Video also clearly showed the invasions of clustered cells toward the collagen matrix, suggesting a collective migration. The collective migration is characterized by

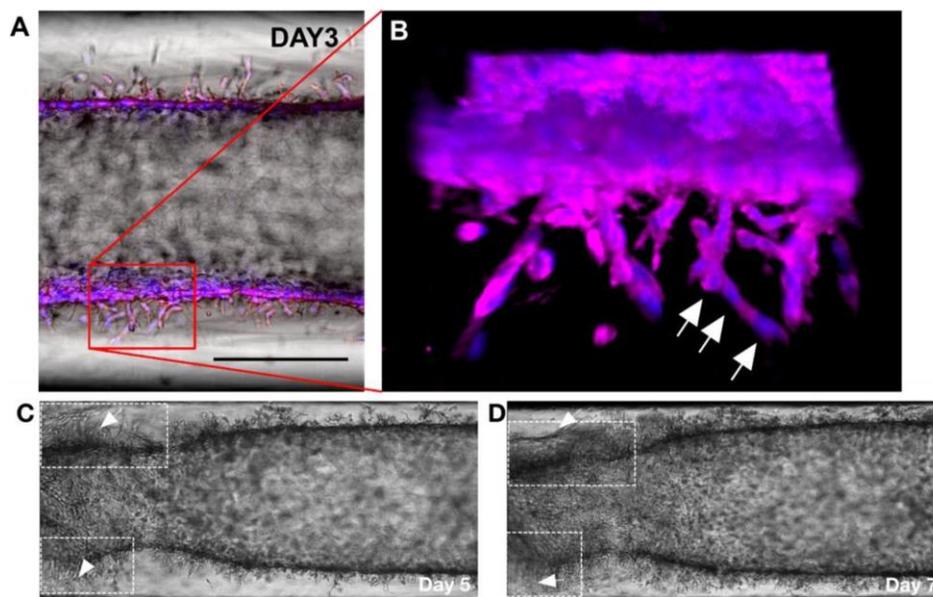


Fig 3. Invasion characteristics of SUM-159PT in IDC-on-chip. (A) Bright field image of SUM-159PT cells in IDC-on-chip at day 3. Scale bar is 300 μm . (B) Confocal micrograph of SUM-159PT at day 3, cells showed characteristics of multicellular collective migration in the protrusion. Cell nuclei along a protrusion are noted with white arrows. Nuclei (blue) and plasma membrane (magenta). (C and D) The duct of SUM-159PT showed regions of matrix collapse, which are thought to be associated with matrix degradation (noted with arrows), it was observed from day 5 to day 7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012.g003>

the movement of cell clusters. Indeed, such movement of cells is shown *in vivo* as a disorganized strand-like mass specifically in the metastatic stage. [39, 40] Furthermore, we noticed that some regions of the collagen collapse from day 5 to day 7, which could be associated with matrix degradation. As one of the key processes supporting the cell invasion, the observation of cell interaction with the matrix degradation supports the considerable potential for SUM-159PT to invade the surrounding matrix. (Fig 3C and 3D) On the other hand, the duct of MDA-MB-231 in IDC-on-chip showed elongated membrane protrusions from individual cells which was confirmed by the presence of a single nucleus for the protrusion as shown in S1 File. The invasive capacity of SUM-159PT, projected in the collective migration and matrix degradation which not shown in MDA-MB-231, implies the invasive and metastatic behaviors can be significantly varied within the TNBC subtypes.

Analysis of cell proliferation and expression of N-cadherin of SUM-159PT cells in IDC-on-chip

One important aspect of the duct in the mammary gland is that it is composed by a monolayer of epithelial cells. Focused on this aspect, we evaluated by Haematoxylin and Eosin staining the characteristics of the duct, we confirm that the duct is formed by a monolayer of cells Fig 4A. Furthermore, we evaluated proliferation Fig 4B and N-cadherin expression (an important protein for migration and cell-cell adhesion) Fig 4C. [41] Migration and proliferation are mutually exclusive biological processes. [42] For cell proliferation we used the BrdU marker

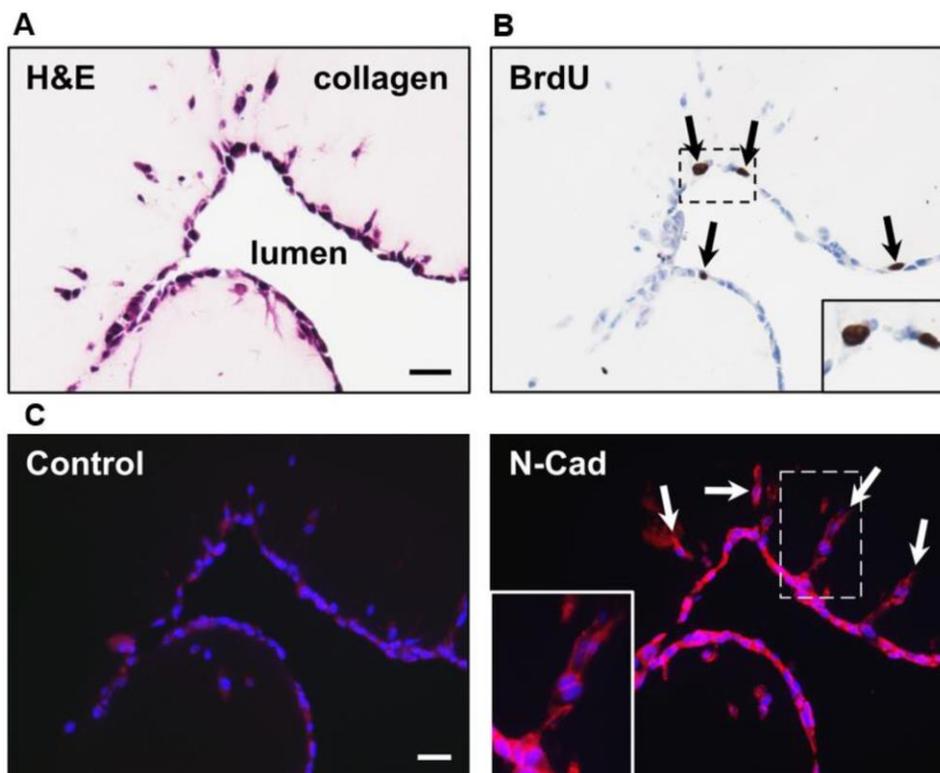


Fig 4. Histology and Immunohistology of SUM-159PT cells in IDC-on-chip. (A) Structure and cell morphology at the duct in IDC-on-chip. Histological staining of the cells in the duct was performed with Haematoxylin and Eosin (H&E) at day 3 of culture. (B) Evaluation of cell proliferation using BrdU assay. (C) Expression of N-cadherin at the protrusions. Nuclei (blue) and N-cadherin (red). N-cadherin is a cell-cell adhesion marker important for migratory and invasive behavior of tumoral cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012.g004>

(BrdU show cells in S phase of cell cycle). We found that some cells at the duct in the IDC-on-chip were proliferating (showed with black arrows) and others were in a non-proliferative state. Cells at the protrusions showed a negative staining for BrdU, which suggest that the migrating cells were in a non-proliferative state. There is a switch between these two cellular fates. [42] Analysis of N-cadherin expression showed that cells at the protrusion express N-cadherin, this support the idea of a collective migration behavior by the SUM-159PT cell line.

Differences in the expression between CD44 and CD24 in 2D culture and IDC-on-chip

The use of a 3D platform like the IDC-on chip for the culture of breast cancer cells are more useful because it resembles some important physiological characteristics and allow the investigation of complex interactions between tumoral cells and stroma. [43] We made the comparison between 2D culture and the IDC-on-chip (Fig 5). Here, we noticed some differences in the expression of CD44 and CD24 between MDA-MB-231 and SUM-159PT. MDA-MB-231 cells

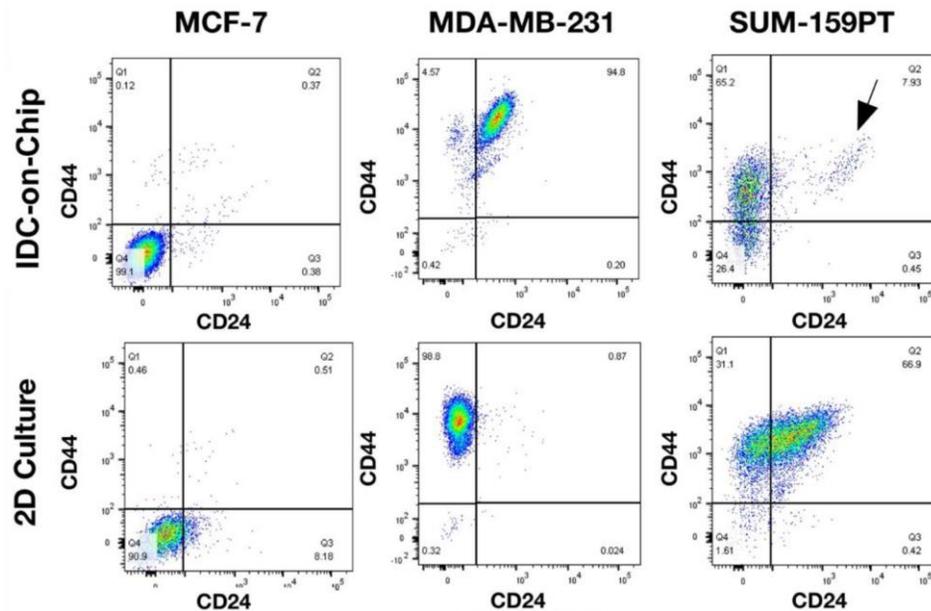


Fig 5. Comparison of the expression of cell surface markers CD44, and CD24 between 2D culture and IDC-on-chip for the three subtype-specific breast cancer cell lines.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012.g005>

culture on IDC-on-chip showed an increase in the expression of CD24, compared to 2D culture. MDA-MB-231 cells on IDC-on-chip were predominantly CD44+/CD24+. In contrast, SUM-159PT cells culture on IDC-on-chip showed an increase in the expression of CD44, compared with 2D culture. SUM-159PT cells on IDC-on-chip were predominantly CD44+/CD24-. CD44+/CD24- expression is associated with cancer stem like properties, chemoresistance and more invasive capacity. [44–46] Which is in accordance with the results of the evaluation on the invasion capacity of SUM-159PT. However, despite the phenotype of MDA-MB-231 in the IDC-on-chip (CD44+/CD24+), this cell line also showed invasion capacity in the IDC-on-chip. Similar, the analysis of the expression of CD44 and CD24 MCF-7 showed no differences between 2D and IDC-on-chip. These results suggest that there are many factors important for the invasion capacity of the cells not only the expression of CD44 and CD24 and that the IDC-on-chip is a good platform to evaluate invasion capacity of tumoral cells.

Discussion

The present model is capable of recapitulating cancer invasion as key pathophysiological processes as well as predicting the invasive potential of subtypes of breast cancer cells. Among three cell lines studied, the MCF-7 cell line is considered non-invasive and non-tumorigenic *in vivo* unless supplemented with estrogen. [16] Thus, the IDC-on-chip platform well predicts the MCF-7 cell line's non-invasive characteristics. On the contrary, TNBCs are thought to be more aggressive and invasive than other breast cancer subtypes. Since TNBCs are a highly diverse group of cancers, several molecular subtypes are identified within TNBCs. [16, 20, 33,

[34\]](#) Both MDA-MB-231 and SUM-159PT are mesenchymal stem-like subtypes, which strongly express genes for EMT, cell motility (Rho pathway), and cellular differentiation. [\[16, 20\]](#) In the IDC-on-chip platform, both TNBC cell lines show distinct invasive characteristics, suggesting a capacity of the present model to characterize the invasive potential of breast cancer cells in quantitative manners. Remarkably, higher invasion capacity was observed in SUM-159PT compared to MDA-MB-231, showing collective migration and collagen matrix degradation. Although further investigation is needed to identify the differences in their molecular mechanisms for invasion, the quantitative comparison for the subtypes demonstrates the capacity of the IDC-on-chip model to develop subtype-specific or patient-specific therapeutic strategies further.

The processes, which are mimicked in the present model, include EMT, remodeling of the surrounding matrix, collective migration of cancer cells. Considering that there are currently no apparent biomarkers to predict the progression from DCIS to IBC, the model presented here can provide a useful testbed to discover biomarkers. Since DCIS is non-invasive, the usage of IBC cells may not be ideal for mimicking DCIS fully. However, since molecular subtypes of DCIS are reported in those of IDC, [\[12, 47\]](#) subtype-specific invasive capacity may be characterized using cancer cells. Recent interests to develop *in vitro* tumor models using microfluidics and tissue engineering have led to many innovative platforms of several cancer types. [\[22, 23\]](#) The usefulness of these systems to precision medicine can be significantly improved with the thorough molecular characterization of cancer cells.

Two TNBC cell lines studied showed increased CD24 expression in IDC-on-chip platforms. CD24 was significantly higher in high-grade DCIS and IDCs than in the non-tumorous breast cells. It was also positively correlated with tumor grade of IDCs. Our results suggest that higher CD24 expression may be associated with malignant transformation and progression in breast cancer biology. Furthermore, higher membranous expression and, in particular, cytoplasmic staining seem to predict malignant transformation, and different patterns of CD24 expression may be associated with different pathological features in breast tumors. [\[48\]](#) In invasive breast carcinomas, CD24 expression was associated with shortened patient overall survival and disease-free survival. [\[49\]](#)

Although the invasion assay using IDC-on chip demonstrate the subtype-specific invasion potential in a context of systematic invasion process involved and controllable manner, it is still limited to recapitulate tumor microenvironment with lack of multiple stroma components fully. Throughout the invasion process, distinct biophysical and biochemical features in the tumor microenvironment (TME) such as hypoxia, the existence of fibroblast, various growth factors, and cytokines play critical roles in regulating the cell response. Specifically, the hypoxia has been reported to enhance cancer cell invasion through hypoxia-induced factor (HIF) activities, which regulate the transcription factors such as Snail, Twist, and matrix metalloproteinase. [\[50–52\]](#) Hypoxia induced Notch signaling was reported to mediate epithelial-mesenchymal transition in breast cancer through enhanced expression of Slug and Snail with e-cadherin suppression. [\[50\]](#) With a benefit of the IDC-on-chip platform to recapitulate the physiological architecture of cancer invasion, the platform can be further improved by applying the complex stroma conditions.

Supporting information

S1 Video. A video clip is provided showing local invasion of SUM-159PT into the collagen matrix.

(AVI)

S1 File. Invasion characteristics of MDA-MB-231 in IDC-on-chip. Confocal micrograph of MDA-MB-231 at day 3, cells show membrane protrusions from individual cells as noted with white arrows. Nuclei (blue) and plasma membrane (magenta). (DOCX)

Acknowledgments

The authors acknowledge the use of confocal microscopy of Purdue Imaging Facility, Bindley Bioscience Center, Purdue University.

Author Contributions

Conceptualization: Hye-ran Moon, Bumsoo Han.

Formal analysis: Hye-ran Moon, Victoria Noe-Kim, Bumsoo Han.

Funding acquisition: Bumsoo Han.

Investigation: Hye-ran Moon, Natalia Ospina-Muñoz, Victoria Noe-Kim, Yi Yang, Bennett D. Elzey.

Methodology: Yi Yang, Bennett D. Elzey, Stephen F. Konieczny.

Supervision: Stephen F. Konieczny, Bumsoo Han.

Visualization: Hye-ran Moon, Natalia Ospina-Muñoz, Victoria Noe-Kim.

Writing - original draft: Hye-ran Moon, Natalia Ospina-Muñoz, Victoria Noe-Kim.

Writing - review & editing: Bennett D. Elzey, Bumsoo Han.

References

1. Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CKY, Hicks J, King TA, et al. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology*. 2013; 7(5):859–69. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.07.005> PMID: 23890733
2. Gorringer KL, Fox SB. Ductal Carcinoma In Situ Biology, Biomarkers, and Diagnosis. *Front Oncol*. 2017; 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00248> PMID: 29109942
3. American Cancer S. Global Burden of Cancer in Women: Current Status, Trends, and Interventions. 2016 2016. ReportNo.
4. Barrio AV, Van Zee KJ. Controversies in the Treatment of Ductal Carcinoma in Situ. *Annu Rev Med*. 2017; 68:197–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-104920> PMID: 28099081
5. Albanese A, Lam AK, Sykes EA, Rocheleau JV, Chan WC. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nature communications*. 2013; 4:2718. <https://doi.org/10.1038/ncomms3718> PMID: 24177351
6. Casasent AK, Edgerton M, Navin NE. Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones. *J Pathol*. 2017; 241(2):208–18. <https://doi.org/10.1002/path.4840> PMID: 27861897
7. Van Bockstal M, Lambein K, Van Gele M, De Vlieghere E, Limame R, Braems G, et al. Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF- β 1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience*. 2014; 1(10):634–48. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.87> PMID: 25593993
8. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K. Role of COX-2 in epithelial–stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(9):3372–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813306106> PMID: 19218449
9. Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, Carrasco D, et al. Regulation of In Situ to Invasive Breast Carcinoma Transition. *Cancer Cell*. 2008; 13(5):394–406. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.03.007> PMID: 18455123
10. Ma X-J, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2009; 11(1):R7. <https://doi.org/10.1186/bcr2222> PMID: 19187537

11. Vargas AC, McCart Reed AE, Waddell N, Lane A, Reid LE, Smart CE, et al. Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 135(1):153–65. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2123-4> PMID: [22718308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22718308/)
12. Clark SE, Warwick J, Carpenter R, Bowen RL, Duffy SW, Jones JL. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *British Journal of Cancer*. 2011; 104(1):120–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606021> PMID: [21139586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21139586/)
13. Hernandez L, Wilkerson PM, Lambros MB, Campion-Flora A, Rodrigues DN, Gauthier A, et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J Pathol*. 2012; 227(1):42–52. <https://doi.org/10.1002/path.3990> PMID: [22252965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252965/)
14. Kim SY, Jung S-H, Kim MS, Baek I-P, Lee SH, Kim T-M, et al. Genomic differences between pure ductal carcinoma in situ and synchronous ductal carcinoma in situ with invasive breast cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(10):7597–607. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3162> PMID: [25831047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25831047/)
15. Krøigård AB, Larsen MJ, Lænkholm A-V, Knoop AS, Jensen JD, Bak M, et al. Clonal expansion and linear genome evolution through breast cancer progression from pre-invasive stages to asynchronous metastasis. *Oncotarget*. 2015; 6(8):5634–49. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3111> PMID: [25730902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25730902/)
16. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006; 10(6):515–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008> PMID: [17157791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17157791/)
17. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012; 486(7403):405–9. <https://doi.org/10.1038/nature11154> PMID: [22722202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22722202/)
18. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011; 121(7):2750–67. <https://doi.org/10.1172/JCI45014> PMID: [21633166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633166/)
19. Makki J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*. 2015; 8:CPATH. S31563.
20. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*. 2010; 32(1–2):35. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307> PMID: [21778573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778573/)
21. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*. 2011; 24(2):157. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200> PMID: [21076464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21076464/)
22. Ozcelikkale A, Moon H-r, Linnes M, Han B. In vitro microfluidic models of tumor microenvironment to screen transport of drugs and nanoparticles. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9:e1460. <https://doi.org/10.1002/wnan.1460> PMID: [28198106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28198106/)
23. Tsai H-F, Trubelja A, Shen AQ, Bao G. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. *Journal of The Royal Society Interface*. 2017; 14(131):20170137. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0137> PMID: [28637915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28637915/)
24. Kwak B, Ozcelikkale A, Shin CS, Park K, Han B. Simulation of complex transport of nanoparticles around a tumor using tumor-microenvironment-on-chip. *Journal of Controlled Release*. 2014; 194:157–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.027> PMID: [25194778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25194778/)
25. Ozcelikkale A, Shin K, Noe-Kim V, Elzey BD, Dong Z, Zhang J-T, et al. Differential response to doxorubicin in breast cancer subtypes simulated by a microfluidic tumor model. *Journal of Controlled Release*. 2017; 266:129–39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.024> PMID: [28939108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28939108/)
26. Shin K, Klosterhoff BS, Han B. Characterization of cell-type specific drug transport and resistance of breast cancers using tumor-microenvironment-on-chip. *Mol Pharmaceutics*. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00131> PMID: [27228477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27228477/)
27. Bersini S, Jeon JS, Dubini G, Arrigoni C, Chung S, Charest JL, et al. A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*. 2014; 35(8):2454–61. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.050> PMID: [24388382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24388382/)
28. Sung KE, Yang N, Pehlke C, Keely PJ, Eliceiri KW, Friedl A, et al. Transition to invasion in breast cancer: a microfluidic in vitro model enables examination of spatial and temporal effects. *Integr Biol (Camb)*. 2011; 3(4):439–50. <https://doi.org/10.1039/c0ib00063a> PMID: [21135965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135965/)
29. Bischel LL, Beebe DJ, Sung KE. Microfluidic model of ductal carcinoma in situ with 3D, organotypic structure. *BMC Cancer*. 2015; 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1007-5> PMID: [25605670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605670/)
30. Choi Y, Hyun E, Seo J, Blundell C, Kim HC, Lee E, et al. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. *Lab on a Chip*. 2015; 15(16):3350–7. <https://doi.org/10.1039/c5lc00514k> PMID: [26158500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26158500/)
31. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(4):215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889> PMID: [21884641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21884641/)

32. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142(2):237–55. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2743-3> PMID: [24162158](#)
33. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14(3):769–78. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0926> PMID: [25713333](#)
34. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation.* 2011; 121:2750–67. <https://doi.org/10.1172/JCI45014> PMID: [21633166](#)
35. Bischel LL, Young EWK, Mader BR, Beebe DJ. Tubeless microfluidic angiogenesis assay with three-dimensional endothelial-lined microvessels. *Biomaterials.* 2013; 34(5):1471–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.005> PMID: [23191982](#)
36. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22:287–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315> PMID: [16824016](#)
37. Onega T, Weaver DL, Frederick PD, Allison KH, Tosteson AN, Carney PA, et al. The diagnostic challenge of low-grade ductal carcinoma in situ. *European Journal of Cancer.* 2017; 80:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.04.013> PMID: [28535496](#)
38. Ozcelikkale A, Dutton JC, Grinnell F, Han B. Effects of dynamic matrix remodelling on en masse migration of fibroblasts on collagen matrices. *Journal of The Royal Society Interface.* 2017; 14 (135):20170287.
39. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 2011; 147(5):992–1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016> PMID: [22118458](#)
40. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009; 10(7):445. <https://doi.org/10.1038/nrm2720> PMID: [19546857](#)
41. Shih W, Yamada S. N-cadherin-mediated cell–cell adhesion promotes cell migration in a three-dimensional matrix. *Journal of cell science.* 2012; 125(15):3661–70.
42. De Donatis A, Ranaldi F, Cirri P. Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Communication and Signaling.* 2010; 8(1):20.
43. Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A, Beebe DJ. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PloS one.* 2013; 8(10).
44. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; 100(7):3983–8.
45. Wang H, Wang L, Song Y, Wang S, Huang X, Xuan Q, et al. CD44+/CD24- phenotype predicts a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncology letters.* 2017; 14(5):5890–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6959> PMID: [29113223](#)
46. Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44 pos CD24 neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research.* 2009; 11(6):R82. <https://doi.org/10.1186/bcr2449> PMID: [19906290](#)
47. Valdez KE, Fan F, Smith W, Allred DC, Medina D, Behbod F. Human primary ductal carcinoma in situ (DCIS) subtype-specific pathology is preserved in a mouse intraductal (MIND) xenograft model. *J Pathol.* 2011; 225(4):565–73. <https://doi.org/10.1002/path.2969> PMID: [22025213](#)
48. Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology—Research and Practice.* 2006; 202(8):569–76. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2006.05.004> PMID: [16828238](#)
49. Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clinical cancer research.* 2003; 9(13):4906–13. PMID: [14581365](#)
50. Chen J, Imanaka N, Chen J, Griffin JD. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *British Journal of Cancer.* 2010; 102(2):351–60. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605486> PMID: [20010940](#)
51. Muñoz-Nájjar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene.* 2006; 25(16):2379–92. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209273> PMID: [16369494](#)
52. Semenza GL. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends in Molecular Medicine.* 2012; 18(9):534–43. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.08.001> PMID: [22921864](#)

ANEXO 3.



Los organizadores del III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2

Otorgan el reconocimiento como MEJOR PRESENTACIÓN PÓSTER en el área
temática de Salud Humana y Animal a:

Ospina Muñoz N, Ortiz Montero P, Vernot J,

Por su trabajo, titulado: *La interleuquina 8 promueve la transición epitelio-mesenquimal, la
adquisición de propiedades stem y la agresividad tumoral en la línea celular MCF-7.*



Harold Duban Ardila
Presidente Comité Organizador C2B2
Presidente SCCQ



Patricia del Portillo
Presidenta Comité Científico C2B2

11. BIBLIOGRAFÍA

krap, N. *et al.* (2016) 'Identification of Distinct Breast Cancer Stem Cell Populations Based on Single-Cell Analyses of Functionally Enriched Stem and Progenitor Pools', *Stem Cell Reports*, 6(1), pp. 121–136. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.006.

Al-Hajj, M. *et al.* (2003) 'Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), pp. 3983–8. doi: 10.1073/pnas.0530291100.

Al-Khalaf, H. H. *et al.* (2019) 'Senescent Breast Luminal Cells Promote Carcinogenesis through Interleukin-8-Dependent Activation of Stromal Fibroblasts', *Molecular and Cellular Biology*, 39(2). doi: 10.1128/mcb.00359-18.

De Angelis, M. L. *et al.* (2019) 'Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance.', *Front Oncol.*, 9(626).

Aponte, P. M. and Caicedo, A. (2017) 'Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment', *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2017/5619472.

Armstrong, A. J. *et al.* (2011) 'Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers', *Molecular Cancer Research*, 9, pp. 997–1007. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0490.

Arvelo, F., Sojo, F. and Cotte, C. (2016) 'Tumour progression and metastasis', *ecancermedicalscience*, 10(617). doi: 10.3332/ecancer.2016.617.

Bachelot, T. *et al.* (2003) 'Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients.', *British journal of cancer*, 88(11), pp. 1721–6. doi: 10.1038/sj.bjc.6600956.

Badve, S. and Nakshatri, H. (2012) 'Breast-cancer stem cells-beyond semantics', *The Lancet Oncology*, 13(1), pp. e43-8. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70191-7.

Bai, K. H. *et al.* (2020) 'Identification of cancer stem cell characteristics in liver hepatocellular carcinoma by WGCNA analysis of transcriptome stemness index', *Cancer Medicine*, 00, pp. 1–9. doi: 10.1002/cam4.3047.

Bailey, P. C. *et al.* (2018) 'Single cell tracking of breast cancer cells enables highly accurate prediction of sphere formation using only early doubling information', *iScience*. Elsevier Inc., 8, pp. 29–39. doi: 10.1016/j.isci.2018.08.015.

Baksh, D., Song, L. and Tuan, R. S. (2004) 'Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(3), pp. 301–316. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.

Balkwill, F., Charles, K. A. and Mantovani, A. (2005) 'Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease', *Cancer Cell*, pp. 211–

217. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.013.

Barrett, L. E. *et al.* (2012) 'Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma', *Cancer Cell*, 21, pp. 11–24. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.025.

Bartholomew, J. N., Volonte, D. and Galbiati, F. (2009) 'Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway', *Cancer Research*, 69(7), pp. 2878–2886. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2857.

Bartkova, J. *et al.* (2006) 'Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints.', *Nature*, 444(7119), pp. 633–637. doi: 10.1038/nature05268.

Battula, V. L. *et al.* (2010) 'Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, 28(8), pp. 1435–1445. doi: 10.1002/stem.467.

Bavik, C. *et al.* (2006) 'The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms', *Cancer Research*, 66(2), pp. 794–802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.

Ben-Porath, I. *et al.* (2008) 'An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors', *Nature Genetics*, 40(5), pp. 499–507. doi: 10.1038/ng.127.

Benoy, I. H. *et al.* (2004) 'Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival', *Clinical Cancer Research*, 10(21), pp. 7157–7162. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0812.

Bhatia, B. *et al.* (2008) 'Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: Cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT', *International Journal of Cancer*, 122(7), pp. 1483–1495. doi: 10.1002/ijc.23222.

Bi, H. *et al.* (2019) 'Interleukin-8 promotes cell migration via CXCR1 and CXCR2 in liver cancer', *Oncology Letters*, 18, pp. 4176–4184. doi: 10.3892/ol.2019.10735.

Bickel, M. (1993) 'The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation.', *Journal of periodontology*, 64, pp. 456–460. Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf%5Cnhttp://europepmc.org/abstract/MED/8315568>.

Boffetta, P. and Hainaut, P. (2018) *Encyclopedia of cancer, Encyclopedia of Cancer*. doi: 10.5860/choice.40-1906.

Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997) 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell', *Nature Medicine*, 7, pp. 730–737. doi: 10.1038/nm0797-730.

Brabletz, T. *et al.* (2005) 'Migrating cancer stem cells - An integrated concept of malignant tumour progression', *Nature Reviews Cancer*, 5, pp. 744–749. doi: 10.1038/nrc1694.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, Rebecca L, *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers

in 185 countries.', *CA: a cancer journal for clinicians*. doi: 10.3322/caac.21492.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, Rebecca L., *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

Camp, E. R. *et al.* (2011) 'Slug expression enhances tumor formation in a noninvasive rectal cancer model', *Journal of Surgical Research*, 170(1), pp. 56–63. doi: 10.1016/j.jss.2011.02.012.

Campisi, J. (2000) 'Cancer, aging and cellular senescence', *In Vivo*, 14(1), pp. 183–188.

Campisi, J. *et al.* (2011) 'Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease?', *Seminars in Cancer Biology*, pp. 354–359. doi: 10.1016/j.semcan.2011.09.001.

Carey, L. A. *et al.* (2006) 'Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.', *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 295(21), pp. 2492–502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492.

Cariati, M. *et al.* (2008) 'Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line', *International Journal of Cancer*, 122(2), pp. 298–304. doi: 10.1002/ijc.23103.

Castro-Vega, L. J. *et al.* (2015) 'The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells', *Carcinogenesis*, 36(10), pp. 1180–1192. doi: 10.1093/carcin/bgv101.

Chaffer, C. L. *et al.* (2011) 'Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), pp. 7950–7955. doi: 10.1073/pnas.1102454108.

Chaffer, C. L. *et al.* (2013) 'Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity', *Cell*, 154(1), pp. 61–74. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.005.

Charafe-Jauffret, E. *et al.* (2009) 'Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature', *Cancer research*, 69(4), pp. 1302–1313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741.

Chen, S. and Huang, E. H. (2014) 'The Colon Cancer Stem Cell Microenvironment Holds Keys to Future Cancer Therapy', *Journal of Gastrointestinal Surgery*, pp. 1040–1048. doi: 10.1007/s11605-014-2497-1.

Choi, H. S. *et al.* (2019) 'Disruption of the NF- κ B/IL-8 Signaling Axis by Sulconazole Inhibits Human Breast Cancer Stem Cell Formation', *Cells*, 8(9), p. 1007.

Colacino, J. A. *et al.* (2018) 'Heterogeneity of Human Breast Stem and Progenitor Cells as Revealed by Transcriptional Profiling', *Stem Cell Reports*. ElsevierCompany., 10, pp. 1596–1609. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.03.001.

Collado, M., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2007) 'Cellular Senescence in Cancer and Aging', *Cell*, pp. 223–233. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003.

Collado, M. and Serrano, M. (2006) 'The power and the promise of oncogene-induced senescence markers.', *Nature reviews. Cancer*, 6(6), pp. 472–476. doi: 10.1038/nrc1884.

Coppé, J.-P. *et al.* (2008) 'Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.', *PLoS biology*, 6(12), pp. 2853–2868. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.

Coppé, J.-P. *et al.* (2010) 'The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression.', *Annual review of pathology*, 5, pp. 99–118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Crabtree, J. S. and Miele, L. (2018) 'Breast cancer stem cells', *Biomedicines*, 6(3). doi: 10.3390/biomedicines6030077.

Davalos, A. R. *et al.* (2010) 'Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression', *Cancer and Metastasis Reviews*, pp. 273–283. doi: 10.1007/s10555-010-9220-9.

Denekamp, J. (1994) 'Tumour stem cells: facts, interpretation and consequences', *Radiotherapy and Oncology*, 30, pp. 6–10. doi: 10.1016/0167-8140(94)90003-5.

Dey, D. *et al.* (2009) 'Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture', *PLoS ONE*, 4(4), p. e5329. doi: 10.1371/journal.pone.0005329.

Dominguez, C. *et al.* (2017) 'Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer', *JCI Insight*, 2(21), p. e94296. doi: 10.1172/jci.insight.94296.

Dominguez, C., David, J. M. and Palena, C. (2017) 'Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor', *Seminars in Cancer Biology*, 47, pp. 177–184. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.002.

Dongre, A. and Weinberg, R. A. (2019) 'New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.

Dontu, G. *et al.* (2003) 'In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells', *Genes Dev*, 17(10), pp. 1253–1270. doi: 10.1101/gad.1061803.

Dumont, N. *et al.* (2013) 'Breast Fibroblasts Modulate Early Dissemination, Tumorigenesis, and Metastasis through Alteration of Extracellular Matrix Characteristics', *Neoplasia*, 15(3), pp. 249–262. doi: 10.1593/neo.121950.

Fernando, R. I. *et al.* (2010) 'The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells', *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), pp. 533–544. doi: 10.1172/JCI38379.

Fernando, R. I. *et al.* (2011) 'IL-8 Signaling Plays a Critical Role in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Carcinoma Cells', *Cancer Research*, 71(15). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0156.

Foster, S. A. *et al.* (1998) 'Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG

island methylation.', *Molecular and cellular biology*, 18(4), pp. 1793–801. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=121409&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Fraser, D. M. *et al.* (2014) 'Aspirin use and survival after the diagnosis of breast cancer: a population-based cohort study.', *British journal of cancer*, 111(April), pp. 1–5. doi: 10.1038/bjc.2014.264.

Friedmann-Morvinski, D. and Verma, I. M. (2014) 'Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells', *EMBO Reports*, 15(3), pp. 244–253. doi: 10.1002/embr.201338254.

Fukumura, D. *et al.* (1998) 'Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells', *Cell*, (6), pp. 715–725. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81731-6.

Gilmore, A. P. (2005) 'Anoikis', *Cell Death and Differentiation*, 12, pp. 1473–1477. doi: 10.1038/sj.cdd.4401723.

Ginestier, C. *et al.* (2010) 'CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts', *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), pp. 485–497. doi: 10.1172/JCI39397.

Gingold, J. *et al.* (2016) 'Modeling Cancer with Pluripotent Stem Cells', *Trends in Cancer*, 2(9), pp. 485–494. doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.007.

Greer, E. L. and Brunet, A. (2005) 'FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.', *Oncogene*, 24(50), pp. 7410–7425. doi: 10.1038/sj.onc.1209086.

Grosse-Wilde, A. *et al.* (2015) 'Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival', *PLoS ONE*, 10(5), p. e0126522. doi: 10.1371/journal.pone.0126522.

Guo, W. *et al.* (2012) 'Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state', *Cell*, 148(5), pp. 1015–1028. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.008.

Gupta, N., Gupta, P. and Srivastava, S. K. (2019) 'Penfluridol overcomes paclitaxel resistance in metastatic breast cancer', *Scientific Reports*, 9(5066). doi: 10.1038/s41598-019-41632-0.

Gyamfi, J. *et al.* (2018) 'Interleukin-6 / STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells', *Scientific Reports*. Springer US, 8, p. 8859. doi: 10.1038/s41598-018-27184-9.

Ha, H., Debnath, B. and Neamati, N. (2017) 'Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases', *Theranostics*, 7(6), pp. 1543–1588. doi: 10.7150/thno.15625.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Haslehurst, A. M. *et al.* (2012) 'EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer', *BMC Cancer*, 12, p. 91. doi: 10.1186/1471-2407-12-91.

Hay, E. (1995) 'An overview of epithelio-mesenchymal transformation', *Acta Anat*, 154(1), pp. 8–20. doi: 10.1159/000147748.

Herrera-Gayol, a and Jothy, S. (1999) 'Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44.', *Experimental and molecular pathology*, 66, pp. 149–156. doi: 10.1006/exmp.1999.2251.

Hiraga, T., Ito, S. and Nakamura, H. (2016) 'EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation', *International Journal of Cancer*, 138(7), pp. 1698–1708. doi: 10.1002/ijc.29921.

Hoadley, K. A. *et al.* (2014) 'Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin', *Cell*, 158, pp. 929–944. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.049.

Hollier, B. G., Evans, K. and Mani, S. A. (2009) 'The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: A coalition against cancer therapies', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(1), pp. 29–43. doi: 10.1007/s10911-009-9110-3.

Hollstein, M. *et al.* (1991) 'p53 mutations in human cancers.', *Science*, 253(5015), pp. 49–53. doi: 10.1126/science.1905840.

Horne, H. N. *et al.* (2018) 'E-cadherin breast tumor expression, risk factors and survival: Pooled analysis of 5,933 cases from 12 studies in the Breast Cancer Association Consortium', *Scientific Reports*, 8(6574). doi: 10.1038/s41598-018-23733-4.

Hu, J. *et al.* (2017) 'A CD44v+ subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 8(3), p. e2679. doi: 10.1038/cddis.2017.72.

Huang, S. *et al.* (2018) 'Cellular communication promotes mammosphere growth and collective invasion through microtubule-like structures and angiogenesis', *Oncology Reports*, 40(6), pp. 3297–3312. doi: 10.3892/or.2018.6778.

Iglesias, J. M. *et al.* (2013) 'Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-cadherin', *PLoS ONE*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077281.

Iliopoulos, D. *et al.* (2011) 'Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp. 1397–402. doi: 10.1073/pnas.1018898108.

Jarrard, D. F. *et al.* (1999) 'p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells', *Cancer Research*, 59(12), pp. 2957–2964.

Johnson, M. (2012) 'Fetal Bovine Serum', *Materials and Methods*, 2, p. 117. doi: 10.13070/mm.en.2.117.

Jolly, M. K. *et al.* (2015) 'Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis', *Frontiers in Oncology*, 5(155). doi: 10.3389/fonc.2015.00155.

Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104.

- Kang, H. *et al.* (2005) 'Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer.', *Breast cancer research : BCR*, 7(4), pp. R402–R410. doi: 10.1186/bcr1022.
- Kim, N. W. *et al.* (1994) 'Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.', *Science (New York, N. Y.)*, 266(5193), pp. 2011–5. doi: 10.1126/science.7605428.
- Kim, S. and Alexander, C. M. (2014) 'Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics', *Biotechnology Letters*, 36(3), pp. 481–488. doi: 10.1007/s10529-013-1393-1.
- Kim, S. Y. *et al.* (2013) 'Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells', *Cellular Signalling*, 25(4), pp. 961–969. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.01.007.
- Knüpfer, H. and Preiß, R. (2007) 'Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review)', *Breast Cancer Research and Treatment*, pp. 129–135. doi: 10.1007/s10549-006-9328-3.
- Korkaya, H. *et al.* (2012) 'Activation of an IL6 Inflammatory Loop Mediates Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer by Expanding the Cancer Stem Cell Population', *Molecular Cell*, 47(4), pp. 570–584. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.014.
- Kröger, C. *et al.* (2019) 'Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(15), pp. 7353–7362. doi: 10.1073/pnas.1812876116.
- Krtolica, A. *et al.* (2001) 'Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), pp. 12072–7. doi: 10.1073/pnas.211053698.
- Kuai, W. X. *et al.* (2012) 'Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells', *World Journal of Gastroenterology*, 18(9), pp. 979–985. doi: 10.3748/wjg.v18.i9.979.
- Lamouille, S., Xu, J. and Derynck, R. (2014) 'Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3758.
- Lanza, R. *et al.* (2009) *Essentials of Stem Cell Biology, Essentials of Stem Cell Biology*. doi: 10.1016/C2009-0-00078-6.
- Lapidot, T. *et al.* (1992) 'Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID Mice', *Science*, 255, pp. 1137–1141. doi: 10.1126/science.1372131.
- Lapidot, T. *et al.* (1994) 'A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.', *Nature*, 367(6464), pp. 645–648. doi: 10.1038/367645a0.
- Lasry, A. and Ben-Neriah, Y. (2015) 'Senescence-associated inflammatory responses: Aging and cancer perspectives', *Trends in Immunology*, pp. 217–228. doi: 10.1016/j.it.2015.02.009.

Lawson, D. A. *et al.* (2015) 'Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells', *Nature*, 526(7571), pp. 131–5. doi: 10.1038/nature15260.

Lecharpentier, A. *et al.* (2011) 'Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/ mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer', *British Journal of Cancer*, 105, pp. 1338–1341. doi: 10.1038/bjc.2011.405.

Li, W. *et al.* (2017) 'Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 13856. doi: 10.1038/s41598-017-14364-2.

Li, Y. *et al.* (2015) 'Slug contributes to cancer progression by direct regulation of ER α signaling pathway', *International Journal of Oncology*, 46(4), pp. 1461–72. doi: 10.3892/ijo.2015.2878.

Lim, E. *et al.* (2009) 'Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers', *Nature Medicine*, 15(8). doi: 10.1038/nm.2000.

Lin, Y. *et al.* (2004) 'Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays', *International Journal of Cancer*, 109(4), pp. 507–515. doi: 10.1002/ijc.11724.

Liu, D. and Hornsby, P. J. (2007) 'Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion', *Cancer Research*, 67(7), pp. 3117–3126. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3452.

Liu, S. *et al.* (2014) 'Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts', *Stem Cell Reports*. The Authors, 2(1), pp. 78–91. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.009.

Long, X. *et al.* (2016) 'IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review)', *International Journal of Oncology*, 48(1), pp. 5–12. doi: 10.3892/ijo.2015.3234.

Louis, S. A. *et al.* (2008) 'Enumeration of Neural Stem and Progenitor Cells in the Neural Colony-Forming Cell Assay', *Stem Cells*, 26(4), pp. 988–96. doi: 10.1634/stemcells.2007-0867.

Lovitt, C. J., Shelper, T. B. and Avery, V. M. (2018) 'Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins', *BMC Cancer*, 18(41). doi: 10.1186/s12885-017-3953-6.

Malhotra, G. K. *et al.* (2010) 'Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers', *Cancer Biology and Therapy*, 10(10), pp. 955–960. doi: 10.4161/cbt.10.10.13879.

Malta, T. M. *et al.* (2018) 'Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation', *Cell*, 173(2), pp. 338–354. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.034.

Mani, S. A. *et al.* (2008) 'The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells', *Cell*, 133(4), pp. 704–715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.

Mantovani, A. *et al.* (2008) 'Tumour immunity: effector response to tumour and role of the

- microenvironment', *The Lancet*, pp. 771–783. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60241-X.
- Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A. and Chaffer, C. L. (2013) 'Cell plasticity and heterogeneity in cancer', *Clinical Chemistry*, 59(1), pp. 168–179. doi: 10.1373/clinchem.2012.184655.
- Martin, T. A. *et al.* (2005) 'Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer', *Ann.Surg.Oncol.*, 12(1068-9265 (Print)), pp. 488–496.
- McDermott, S. P. and Wicha, M. S. (2010) 'Targeting breast cancer stem cells', *Molecular Oncology*, pp. 404–419. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.005.
- Milanovic, M. *et al.* (2018) 'Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness', *Nature*, 553, pp. 96–100. doi: 10.1038/nature25167.
- Mitra, A., Mishra, L. and Li, S. (2015) 'EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance', *Oncotarget*, pp. 10697–10711. doi: 10.18632/oncotarget.4037.
- Morel, A.-P. P. *et al.* (2008) 'Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition', *PloS one*, 3(8), p. e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
- Naor, D. *et al.* (2002) 'CD44 in cancer', *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 39(6), pp. 527–579. doi: 10.1080/10408360290795574.
- Nieto, M. A. (2002) 'The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(3), pp. 155–66. doi: 10.1038/nrm757.
- Nieto, M. A. *et al.* (2016) 'EMT: 2016', *Cell*, 166(1), pp. 21–45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- Ning, Y. *et al.* (2011) 'Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models', *International Journal of Cancer*, 128(9), pp. 2038–2049. doi: 10.1002/ijc.25562.
- Olumi, A. F. *et al.* (1999) 'Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium', *Cancer Research*, 59, pp. 5002–5011.
- Ortiz-Montero, P. *et al.* (2018) 'CD24 expression and stem-associated features define tumor cell heterogeneity and tumorigenic capacities in a model of carcinogenesis', *Cancer Management and Research*, 10, pp. 5767–5784. doi: 10.2147/CMAR.S176654.
- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A. and Vernet, J. P. (2017) 'Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line', *Cell Communication and Signaling*. Cell Communication and Signaling, 15(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s12964-017-0172-3.
- Osta, W. A. *et al.* (2004) 'EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy', *Cancer Research*, 64, pp. 5818–5824. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0754.
- Palena, C., Hamilton, D. H. and Fernando, R. I. (2012) 'Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment', *Future Oncol.*, 8(6), pp. 713–

722. doi: 10.2217/fon.12.59.Influence.

Paoli, P., Giannoni, E. and Chiarugi, P. (2013) 'Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833, pp. 3481–3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.

Pardali, K. and Moustakas, A. (2007) 'Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1775, pp. 21–62. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.06.004.

Park, S. H. *et al.* (2012) 'Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers', *Nature*, 491(7426), pp. 779–783. doi: 10.1038/nature11580.

Pastushenko, I. and Blanpain, C. (2019) 'EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis', *Trends in Cell Biology*, 29(3), pp. 212–226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.

Pece, S. *et al.* (2010) 'Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content', *Cell*, 140(1), pp. 62–73. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.007.

Pei, J., Wang, Y. and Li, Y. (2020) 'Identification of key genes controlling breast cancer stem cell characteristics via stemness indices analysis', *Journal of Translational Medicine*, 18(1), p. 74. doi: 10.1186/s12967-020-02260-9.

Plaks, V., Kong, N. and Werb, Z. (2015) 'The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?', *Cell Stem Cell*, pp. 225–238. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015.

Polyak, K. and Kalluri, R. (2010) 'The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a003244.

Ponti, D. *et al.* (2005) 'Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties', *Cancer Research*, 65(13), pp. 5506–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.

Powan, P. *et al.* (2017) 'Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 313(5), pp. C556–C566. doi: 10.1152/ajpcell.00096.2017.

Quail, D. F. and Joyce, J. A. (2013) 'Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.', *Nature medicine*, 19(11), pp. 1423–1437. doi: 10.1038/nm.3394.

Rajendran, V. and Jain, M. V. (2018) *In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells*, *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-7401-6_8.

Ren, J. L. *et al.* (2009) 'Inflammatory signaling and cellular senescence', *Cellular Signalling*, pp. 378–383. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.10.011.

Reya, T *et al.* (2001) 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells.', *Nature*, 414(6859), pp. 105–11. doi: 10.1038/35102167.

- Reya, Tannishtha *et al.* (2001) 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells', *Nature*, 414, pp. 105–111. doi: 10.1038/35102167.
- Rich, J. N. (2016) 'Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity', *Medicine*, 95(S1), pp. S2–S7. doi: 10.1038/nrm3584.
- Rothwell, P. M. *et al.* (2011) 'Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: Analysis of individual patient data from randomised trials', *The Lancet*, 377(9759), pp. 31–41. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62110-1.
- Sansone, P. *et al.* (2007) 'IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland', *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), pp. 3988–4002. doi: 10.1172/JCI32533.
- Sarrio, D. *et al.* (2012) 'Epithelial and Mesenchymal Subpopulations Within Normal Basal Breast Cell Lines Exhibit Distinct Stem Cell/Progenitor Properties', *Stem Cells*, 30(2), pp. 292–303. doi: 10.1002/stem.791.
- Schäfer, M. and Werner, S. (2008) 'Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), pp. 628–38. doi: 10.1038/nrm2455.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method', *Nature Protocols*, 3(6), pp. 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Serrano, M. *et al.* (1997) 'Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a)', *Cell*, 88(5), pp. 593–602. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997) 'A survey of telomerase activity in human cancer', *European Journal of Cancer*, 33(5), pp. 787–791. doi: 10.1016/s0959-8049(97)00062-2.
- Singh, J. K. *et al.* (2013) 'Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells.', *Breast cancer research : BCR*, 15(4), p. 210. doi: 10.1186/bcr3436.
- Smit, L. *et al.* (2016) 'An integrated genomic approach identifies that the PI3K/AKT/FOXO pathway is involved in breast cancer tumor initiation.', *Oncotarget*, 7(3), pp. 2596–610. doi: 10.18632/oncotarget.6354.
- Smyrek, I. *et al.* (2019) 'E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity', *Biology Open*, 8. doi: 10.1242/bio.037051.
- Sneath, R. J. and Mangham, D. C. (1998) 'The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia.', *Molecular pathology : MP*, 51(4), pp. 191–200. doi: 10.1136/mp.51.4.191.
- Stemmler, M. P. *et al.* (2019) 'Non-redundant functions of EMT transcription factors', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/s41556-018-0196-y.

- Streicher, S. a *et al.* (2014) 'Case-control study of aspirin use and risk of pancreatic cancer.', *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(7), pp. 1254–63. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1284.
- Strouhalova, K. *et al.* (2020) 'Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment', *Cancers*, 12(184). doi: 10.3390/cancers12010184.
- Taddei, M. L. *et al.* (2012) 'Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases', *Journal of Pathology*, 226, pp. 380–393. doi: 10.1002/path.3000.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*, 126, pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tam, W. L. and Weinberg, R. A. (2013) 'The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1438–1449. doi: 10.1038/nm.3336.
- Thiery, J. P. *et al.* (2009) 'Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease', *Cell*, pp. 871–890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Todorović-Raković, N. and Milovanović, J. (2013) 'Interleukin-8 in Breast Cancer Progression', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(10), pp. 563–70. doi: 10.1089/jir.2013.0023.
- Vernot, J. P. (2020) 'Senescence-Associated Pro-inflammatory Cytokines and Tumor Cell Plasticity', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(63).
- Visvader, J. E. (2009) 'Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis', *Genes and Development*, 23(22), pp. 2563–2577. doi: 10.1101/gad.1849509.
- Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2008) 'Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.', *Nature reviews. Cancer*, 8(10), pp. 755–68. doi: 10.1038/nrc2499.
- Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2012) 'Cancer stem cells: Current status and evolving complexities', *Cell Stem Cell*, pp. 717–728. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.007.
- Wang, R. *et al.* (2014) 'Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors', *Journal of Thoracic Disease*, 6(6), pp. 829–837. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38.
- Wang, Y. and Zhou, B. P. (2013) 'Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis.', *Cancer hallmarks*, 1(1), pp. 38–49. doi: 10.1166/ch.2013.1004.
- Waugh, D. J. J. and Wilson, C. (2008) 'The interleukin-8 pathway in cancer', *Clinical Cancer Research*, 14(21), pp. 6735–6741. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.
- Weitzenfeld, P. *et al.* (2013) 'Progression of luminal breast tumors is promoted by ménage à trois between the inflammatory cytokine TNF α and the hormonal and growth-supporting arms of the tumor microenvironment', *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2013/720536.

- Weitzenfeld, P., Meshel, T. and Ben-baruch, A. (2016) 'Microenvironmental networks promote tumor heterogeneity and enrich for metastatic cancer stem-like cells in Luminal-A breast tumor cells', *Oncotarget*, 7(49), pp. 81123–81143. doi: 10.18632/oncotarget.13213.
- Wu, Y. and Zhou, B. P. (2010) 'TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion.', *British journal of cancer*, 102(4), pp. 639–44. doi: 10.1038/sj.bjc.6605530.
- Xie, G. *et al.* (2012) 'IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures', *International Journal of Oncology*, 40(4), pp. 1171–1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275.
- Xu, R., Chen, L. and Yang, W. T. (2019) 'Aberrantly elevated Bmi1 promotes cervical cancer tumorigenicity and tumor sphere formation via enhanced transcriptional regulation of Sox2 genes', *Oncology Reports*, 42, pp. 688–696. doi: 10.3892/or.2019.7188.
- Xue, W. *et al.* (2007) 'Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.', *Nature*, 445(7128), pp. 656–60. doi: 10.1038/nature05529.
- Yang, J. *et al.* (2004) 'Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis', *Cell*, 117(7), pp. 927–939. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.006.
- Yao, C., Lin, Y., Chua, M. S., *et al.* (2007) 'Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells', *International Journal of Cancer*, 121, pp. 1949–1957. doi: 10.1002/ijc.22930.
- Yao, C., Lin, Y., Ye, C. S., *et al.* (2007) 'Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer', *Chinese Medical Journal*, 120(20), pp. 1766–1772.
- Yersal, O. and Barutca, S. (2014) 'Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications.', *World journal of clinical oncology*, 5(3), pp. 412–24. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412.
- Younis, L. K., El Sakka, H. and Haque, I. (2007) 'The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer.', *International journal of health sciences*, 1(1), pp. 43–51.
- Zeisberg, M. and Neilson, E. G. (2009) 'Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 1429–1437. doi: 10.1172/JCI36183.
- Zhang, C. *et al.* (2016) 'Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(14), pp. E2047–E2056. doi: 10.1073/pnas.1602883113.
- Zhang, J. *et al.* (2018) 'Mechanisms by which CXCR4/CXCL12 cause metastatic behavior in pancreatic cancer', *Oncology Letters*, 15, pp. 1771–1776. doi: 10.3892/ol.2017.7512.
- Zhang, P. *et al.* (2010) 'Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression', *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), pp. 9180–9189. doi: 10.1074/jbc.M109.077958.
- Zhang, Y. *et al.* (2020) 'mRNAsi index: Machine learning in mining lung adenocarcinoma stem cell biomarkers', *Genes*, 11(257). doi: 10.3390/genes11030257.

Zheng, H. *et al.* (2020) 'An absolute human stemness index associated with oncogenic dedifferentiation', *Briefings in Bioinformatics*, 00(00), pp. 1–10. doi: 10.1093/bib/bbz174.

Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, Lin J, Tan S, Tian Y, Liao Q, and C. D. (2017) 'Cancer stem cells in progression of colorectal cancer.', *Oncotarget*, 9(70), pp. 33403–33415.